

Dissertation

**c-di-GMP-abhängige  
Signaltransduktion bei der Kontrolle der  
Cellulose-Synthese in *Escherichia coli*  
Biofilmen**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Im Fach Biologie

Eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

An der Humboldt-Universität zu Berlin

**M. Sc. Anja Richter**

Dekan: Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. Regine Hengge  
                             2. Prof. Dr. Erwin Schneider  
                             3. Prof. Dr. Kürşad Turgay

Datum der Einreichung:      22. September 2015

Datum der Promotion:      21. Januar 2016



Diese Dissertation entstand in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin und der Humboldt-Universität zu Berlin zwischen April 2011 und Mai 2015.





## Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

**Richter AM, Povolotsky TL, Wieler LH, Hengge R** (2014) Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. *EMBO molecular medicine* 6(12): 1622-1637. doi: 10.15252/emmm.201404309.

(AM Richter und TL Povolotsky haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen)

**Serra DO, Richter AM, Hengge R** (2013) Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *J Bacteriol* 195(24): 5540-5554. doi: 10.1128/JB.00946-13.

(DO Serra und AM Richter haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen)

**Serra DO, Richter AM, Klauck G, Mika F, Hengge R** (2013) Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* 4(2):e00103-13. doi: 10.1128/mBio.00103-13.

# Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Regine Hengge, die es mir ermöglichte, dieses Thema in ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten und mir darüber hinaus immer wieder die Möglichkeit gab, meine Arbeit auf Konferenzen zu präsentieren. Besonders in diesem Zusammenhang habe ich nicht nur viele aufregende Orte gesehen, sondern auch zahlreiche interessante Menschen (und ihre Bakterien) kennengelernt. Ich danke ihr darüber hinaus für die kompetente Betreuung und die ansteckende Begeisterung für dieses Thema.

Bei Prof. Dr. Erwin Schneider möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit und die Bereitstellung der zur Nanodisc-Herstellung nötigen Plasmide und Proteine bedanken.

Vielen Dank an Prof. Dr. Kürşad Turgay für die Begutachtung dieser Arbeit und die Hilfe und Unterstützung, die du mir in den letzten Jahren entgegengebracht hast.

Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich dafür danken, dass er mich bereits während meines Bachelor-Studiums für die spannende Thematik mikrobieller Biofilme begeistern konnte.

Ganz besonders danke ich Giesela, die in den letzten Jahren nicht nur eine hervorragende Mentorin war, sondern zum richtigen Zeitpunkt auch Freundin oder gar Mutter-Ersatz. Gleiches gilt für Diego, mit dem ich nicht nur im Labor, sondern auch auf Konferenzen viel Spaß hatte. Ich hoffe inständig, wir laufen uns von Zeit zu Zeit noch einmal über den Weg. Liebsten Dank an Alex für all die aufschlussreichen Gespräche über „Makrobiologie“, geheime Berufswünsche, Löcher im Katzenfell und natürlich auch die kompetente fachliche Hilfe. Vielen Dank an Natalia und Sandra, die ihr Wissen mit mir geteilt und mir viel beigebracht haben. Einen lieben Dank auch an Olga – jetzt bist du die große Doktorandin!

Eine feste Umarmung gebührt meiner Labornachbarin Susi, für liebe Gespräche, viel Kaffee und alle die anderen Dingen, die wir erlebt haben. Ich hoffe, du hast mit den frischen Doktoranden genauso viel Spaß. Weitere Umarmungen und High-Fives für Vanessa und Martin. Vielen Dank an Tatyana für die Zusammenarbeit im Rahmen des O104:H4-Projektes und deinen Hinweis, der mir Christian eingebracht hat.

Vielen Dank an Prof. Eitinger und Friedrich für proteinöse Hilfestellungen und viele lustige Momente.

Mein Dank gilt auch allen ehemaligen Mitgliedern der AG Hengge/Eitinger/Turgay für die freundschaftliche Atmosphäre, Taschentücher und Kuchen, eure Hilfsbereitschaft und die Motivation, die ich aus Gesprächen mit euch mitnahm. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die „Großen“ (Franzi Mika, Nicole, Christina, Tim) aber auch Eberhard und Herr Fiebig, die mir nicht nur unglaublich viel beigebracht haben, sondern mir während der gemeinsamen Jahre durchaus ans Herz gewachsen sind. Gleiches gilt für Christine und all ihre Garten- und Mops-Geschichten. Des Weiteren sollen auch organisatorische Bienchen im Hintergrund nicht vernachlässigt werden: vielen Dank an Felicitas, Frau Wurm, Raul, Mike, Arnhild & Angelika. Ein besonderer Dank geht an Heidi Landesser (AG Schneider) für ihre Nanodisc-Hilfestellung.

Ohne den Dank an die Übrigen zu schmälern, möchte ich an dieser Stelle besonders Franzi Skopp hervorheben. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit, die vielen Gespräche, süße Schokolade und salzige Tränen und all die Gelbilder, die wir zusammen betrachtet haben. Du hast einen großen Fußabdruck hinterlassen.

Großer Dank gilt auch allen anderen Freunden und Gefährten, seien sie zwei- oder vierbeinig, real oder ausgedacht, aus Fleisch und Blut oder Papier, die an dieser Stelle nicht erwähnt wurden.

Mein größter Dank gebührt neben eben Genannten besonders meinen Eltern und meiner Schwester Annelie, die mir nicht nur Studium und Promotion ermöglicht haben. Ihr drei habt mich wie Niemand anderes geformt und verbogen, mit mir gelacht und mich in schlimmen Zeiten im Arm gehalten und mich zu dem Menschen erzogen, der ich heute bin.

An letzter Stelle bleibt noch Christian zu erwähnen, der nicht nur symbolisch das Heilige Römische Reich für mich erobert hat, sondern mir in den letzten Jahren auch jeden einzelnen Tag die Welt zu Füßen gelegt hat.

# Inhaltsverzeichnis

Publikationen.....	5
Danksagung.....	6
Abbildungsverzeichnis .....	12
Tabellenverzeichnis .....	14
Abkürzungen .....	15
Zusammenfassung .....	17
Summary .....	19
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>21</b>
1.1. Bakteriellcs Wachstum und dessen Regulation in <i>Escherichia coli</i> .....	21
1.1.1. Das Konzept vom „bakteriellen Lebensstil“ .....	21
1.1.2. Regulation durch Sigmafaktoren, Transkriptionsfaktoren .....	
und sekundäre Botenstoffe.....	23
1.2. Das Signalmolekül zyklisches di-GMP .....	26
1.2.1. Synthese und Abbau von c-di-GMP .....	27
1.2.2. Generelle Prinzipien der c-di-GMP-vermittelten .....	
Signaltransduktion.....	30
1.2.3. c-di-GMP-bindende Effektoren .....	33
1.2.4. Die c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion in <i>E. coli</i> .....	35
1.3. Bakterielle Cellulose als Matrixkomponente .....	39
1.3.1. An der Cellulose-Synthese beteiligte Komponenten.....	40
1.3.2. Formen der chemischen Modifikation und supramolekulare ..	
Struktur.....	43
1.3.3. Regulation durch c-di-GMP .....	44
1.3.4. Bedeutung bei der Biofilmbildung.....	46
1.3.5. Andere c-di-GMP-regulierte Exopolysaccharide .....	47
1.4. <i>Escherichia coli</i> als Humanpathogen.....	48
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>51</b>
<b>3. Materialien und Methoden.....</b>	<b>53</b>
3.1. Geräte .....	53
3.2. Chemikalien .....	54

---

3.3. Rezepte für Flüssigmedien und Agarplatten .....	54
3.3.1. Flüssigmedien.....	54
3.3.2. Festmedien.....	56
3.4. Verwendete Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide .....	57
3.5. Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	64
3.5.1. Sterilisation .....	64
3.5.2. Wachstumsbedingungen .....	65
3.5.3. Aufbewahrung von Bakterienstämmen .....	65
3.5.4. Antibiotika .....	65
3.5.5. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen.....	65
3.5.6. Herstellung eines P1-Lysates .....	66
3.5.7. P1-Transduktion.....	66
3.5.8. Untersuchungen zur Biofilmbildung auf Festmedien.....	66
3.5.9. Bestimmung der spontanen Mutationsfrequenz.....	67
3.6. Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	67
3.6.1. Verwendete Kits.....	67
3.6.2. Isolierung chromosomaler DNA .....	68
3.6.3. Verwendete Oligonukleotide .....	68
3.6.4. Polymerasekettenreaktion .....	73
3.6.5. Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt-PCR.....	74
3.6.6. Agarose-Gelelektrophorese .....	74
3.6.7. Restriktionsverdau.....	75
3.6.8. Ligation von Insert und Vektor .....	75
3.6.9. Elektrotransformation .....	76
3.6.10. TSS-Transformation.....	76
3.6.11. Inaktivierung chromosomaler Gene zur Erzeugung von .....	
Knockout-Mutanten nach Datsenko & Wanner .....	77
3.6.12. Generierung von Punktmutationen im Chromosom .....	78
3.6.13. Herstellung translationaler <i>lacZ</i> -Fusionen und deren .....	
Kreuzung ins Chromosom.....	78
3.7. Biochemische Arbeitsmethoden.....	79
3.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach .....	
Lämmli.....	79
3.7.2. Sensitive Coomassiefärbung von SDS-Gelen.....	80
3.7.3. Immunoblot-Analyse (Western-Blot).....	80
3.7.4. Bestimmung der Genexpression mittels .....	
$\beta$ -Galaktosidase-Assay nach Miller.....	81

---

3.8. Protein-basierte Methoden.....	82
3.8.1. Überexpression und Aufreinigung von löslichen Proteinen..	82
3.8.2. Überexpression und Aufreinigung von Membran-Proteinen	83
3.8.3. Überexpression von Gürtelproteinen ..... (Membrane-Scaffold-Protein).....	85
3.8.4. Inkorporation von Membran-Proteinen in Nanodiscs .....	85
3.8.5. Nachweis enzymatischer Aktivität von DGCs/ PDEs nach .... Christen et al. ....	86
3.8.6. Bacterial-Two-Hybrid-Assay zur Untersuchung von Protein-.. Protein-Interaktionen <i>in vivo</i> nach Karimova et al.....	88
3.9. Datenbanken und bioinformatische Analysen .....	89
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>91</b>
4.1. Etablierung eines Cellulose-produzierenden <i>E. coli</i> K-12 zur ..... Untersuchung der Biofilmbildung .....	91
4.1.1. Trotz hoch-konservierten <i>bcs</i> -Lokus synthetisiert <i>E. coli</i> ..... K-12 keine Cellulose .....	91
4.1.2. Die Wiederherstellung der Cellulose-Synthese in <i>E. coli</i> K-12	93
4.1.3. Die <i>bcsQ</i> -Punktmutation unterbindet die Transkription von ... <i>bcsQABZC</i> .....	95
4.1.4. Die Expression des Cellulose-Komplexes ist RpoS-aktiviert .	98
4.2. Makrokolonie-Biofilme als Indikator für die Synthese von ..... Matrixsubstanzen.....	100
4.2.1. Curli Fimbrien und Cellulose formen die Struktur von ..... Makrokolonien .....	100
4.2.2. Globale Biofilm-Regulatoren und deren Einfluss auf die ..... Synthese von Matrix-Bestandteilen.....	101
4.2.3. Flagellen als Bestandteil der Makrokolonie .....	102
4.2.4. c-di-GMP als Regulator von Curli Fimbrien und Cellulose .	105
4.3. DgcC und PdeK wirken spezifisch auf die Cellulose-Synthese .....	112
4.3.1. DgcC und PdeK sind Transmembran-Proteine.....	112
4.3.2. Untersuchungen zur c-di-GMP-abhängigen Enzymaktivität	113
4.3.3. c-di-GMP reguliert die Cellulose-Synthese auf ..... post-translationaler Ebene .....	119
4.4. Protein-Interaktionsstudien zwischen DgcC, PdeK und dem ..... Cellulose-Komplex .....	120
4.4.1. DgcC und PdeK interagieren über BcsB mit dem ..... Cellulose-Synthese-Komplex .....	121

---

4.4.2. DgcC und PdeK dimerisieren mittels ihrer Transmembran-Domänen.....	125
4.4.3. DgcC und PdeK bilden einen Komplex innerhalb der Membran.....	129
4.5. Molekulare Funktion von DgcC und PdeK bei der Cellulose-Regulation.....	132
4.5.1. DgcC-generiertes c-di-GMP aktiviert die Cellulose-Synthese.....	132
4.5.2. Das GGDEF-EAL-Domänen-Protein PdeK inhibiert die Cellulose-Synthese.....	137
4.5.3. PdeK wirkt als Antagonist zu DgcC auf die Cellulose-Synthese.....	139
4.6. Weitere regulatorische Faktoren der Cellulose-Synthese-Maschinerie.....	141
4.7. Untersuchungen zur Biofilmbildung des <i>E. coli</i> O104:H4-Ausbruchstammes 2011.....	144
4.7.1. GGDEF-/EAL-kodierende Gene von O104:H4 und verwandten EAEC.....	144
4.7.2. Humanpathogene <i>E. coli</i> unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Matrixsubstanzen.....	145
4.7.3. <i>E. coli</i> O104:H4 produziert keine Cellulose.....	148
4.7.4. Die <i>csgD</i> -Expression in <i>E. coli</i> O104:H4 ist nicht Temperatur-reguliert.....	150
4.7.5. O104:H4 generiert stabile Subpopulationen mit erhöhtem CsgD-Spiegel.....	152
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>157</b>
5.1. Die „Reparatur“ der Cellulose-Biosynthese in <i>E. coli</i> K-12 AR3110.....	157
5.2. Ein c-di-GMP-Modul aus DgcC und PdeK reguliert die Cellulose-Synthese.....	159
5.3. Lokale Signaltransduktion durch Aufbau eines c-di-GMP-Gradienten.....	163
5.4. Veränderte Biofilm-Matrix-Produktion als mögliche Erklärung für die hohe Virulenz des <i>E. coli</i> O104:H4.....	168
<b>6. Anhang.....</b>	<b>173</b>
<b>7. Referenzen.....</b>	<b>177</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.</b> Synthese, Funktion und Abbau von c-di-GMP .....	31
<b>Abb. 2.</b> Regulation von Motilität und CsgD-abhängiger Matrixproduktion in <i>E. coli</i> .....	38
<b>Abb. 3.</b> Der Cellulose-Synthese-Komplex als Bestandteil der inneren Zellmembran .....	42
<b>Abb. 4.</b> Der <i>bcs</i> -Lokus im Cellulose-negativen <i>E. coli</i> K-12 zeigt mehrere Substitutionen im Vergleich zum EAEC 55989 .....	92
<b>Abb. 5.</b> Zeitlicher Verlauf der Makrokolonie-Entwicklung von W3110 und AR3110 .....	94
<b>Abb. 6.</b> Das <i>E. coli</i> K-12 W3110-Derivat AR3110 bildet Cellulose .....	95
<b>Abb. 7.</b> Konstruktion von <i>yhjR</i> -, <i>bcsQ</i> - und <i>bcsA::lacZ</i> -Reporterfusionen und ihre Expression auf Festmedium .....	97
<b>Abb. 8.</b> Expression der <i>lacZ</i> -Reporterfusionen von <i>yhjR</i> , <i>bcsQ</i> und <i>bcsA</i> in Flüssigkultur entlang der Wachstumskurve bei 28°C .....	98
<b>Abb. 9.</b> <i>yhjR::lacZ</i> - und <i>bcsA::lacZ</i> -Expression in Abhängigkeit von <i>rpoS</i> .....	99
<b>Abb. 10.</b> Das Zusammenspiel von Curli und Cellulose bestimmt die Struktur von Makrokolonien .....	101
<b>Abb. 11.</b> RpoS, MlrA und CsgD regulieren die Synthese von Curli Fimbrien und Cellulose .....	102
<b>Abb. 12.</b> Die Flagellare Gen-Kaskade moduliert die Struktur von Makrokolonien	104
<b>Abb. 13.</b> Makrokolonien im Curli und Cellulose produzierenden AR3110 und den entsprechenden 29 GGDEF/EAL-Gen-Deletionen .....	107
<b>Abb. 14.</b> Calcofluor-Bindung im AR3110 und den entsprechenden 29 GGDEF/EAL-Gen-Deletionen .....	108
<b>Abb. 15.</b> Die Curli-Expression wird durch verschiedene DGCs und PDEs reguliert .....	111
<b>Abb. 16.</b> DgcC und PdeK sind in der Membran verankerte Multi-Domänen- Proteine .....	113
<b>Abb. 17.</b> PdeK und PdeD sind aktive PDEs und setzen c-di-GMP zu pGpG um	115
<b>Abb. 18.</b> Membran-gebundenes DgcC setzt GTP zu c-di-GMP um .....	117
<b>Abb. 19.</b> DgcC in Nanodiscs setzt GTP mit einer $K_d$ von 2,0 $\mu$ M um .....	118
<b>Abb. 20.</b> <i>bcsA::lacZ</i> wird nicht durch zelluläre c-di-GMP-Level reguliert .....	120
<b>Abb. 21.</b> DgcC und PdeK interagieren mit dem Cellulose-Synthese-Apparat .....	123
<b>Abb. 22.</b> DgcC und PdeK interagieren unabhängig von ihren cytoplasmatischen Domänen mit BcsB .....	125
<b>Abb. 23.</b> DgcC dimerisiert innerhalb der inneren Zellmembran .....	127
<b>Abb. 24.</b> PdeK dimerisiert innerhalb der inneren Zellmembran .....	128
<b>Abb. 25.</b> DgcC und PdeK interagieren innerhalb der inneren Membran .....	130
<b>Abb. 26.</b> Co-Expression und Co-Elution von DgcC und PdeK .....	131



---

<b>Abb. 27.</b> DgcC reguliert die Cellulose-Synthese positiv in Abhängigkeit seines GGDEF-Motivs .....	133
<b>Abb. 28.</b> Komplementierung von Cellulose-negativer <i>dgcC</i> -Mutation und <i>dgcC</i> -GGAAF-Variante .....	135
<b>Abb. 29.</b> <i>dgcC</i> -Mutationen können durch Plasmid-kodierte DGCs komplementiert werden .....	136
<b>Abb. 30.</b> PdeK reguliert die Cellulose-Synthese negativ in Abhängigkeit seines EAL-Motivs .....	138
<b>Abb. 31.</b> Die chromosomale Deletion der periplasmatischen Domäne von PdeK und deren Einfluss auf die Koloniemorphologie .....	139
<b>Abb. 32.</b> Der Cellulose-negative Phänotyp von $\Delta dgcC$ kann nicht durch Deletion von <i>pdeK</i> aufgehoben werden .....	140
<b>Abb. 33.</b> Komplementierung Cellulose-negativer bzw. reduzierter <i>bcs</i> -Mutationen mit pCAB- <i>dgcC</i> .....	143
<b>Abb. 34.</b> Makrokolonie-Morphologie pathogener <i>E. coli</i> im Vergleich zum kommensalen <i>E. coli</i> K-12 W3110 .....	146
<b>Abb. 35.</b> Pathogene <i>E. coli</i> zeigen Temperatur- und Stamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Congo-Rot-Bindung .....	148
<b>Abb. 36.</b> EAEC zeigen Stamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Cellulose zu synthetisieren .....	149
<b>Abb. 37.</b> Zelluläre Level des Biofilm-Regulators CsgD in Makrokolonien .....	151
<b>Abb. 38.</b> Makrokolonien des O104:H4 Ausbruchstamms generieren Subpopulationen mit erhöhten CsgD-Level .....	152
<b>Abb. 39.</b> Die generierten Subpopulationen mit verstärkter Congo-Rot-Bindung sind genetisch stabil .....	154
<b>Abb. 40.</b> Spontane Mutationsfrequenzen der untersuchten <i>E. coli</i> -Stämme .....	155
<b>Abb. 41.</b> DgcC generiert nahe der Zellmembran einen lokalen c-di-GMP-Gradienten, der BcsA aktiviert oder durch PdeK abgebaut wird .....	167
 <b>Abb. A1.</b> Makrokolonien im Curli produzierenden W3110 und den entsprechenden 29 GGDEF/EAL-Gen-Deletionen .....	174
<b>Abb. A2.</b> Makrokolonien im Cellulose produzierenden AR3110 $\Delta csgB$ und den 29 GGDEF/ EAL-Gen-Deletionen im $\Delta csgB$ -Hintergrund nach drei (oben) bzw. sechs (unten) Tagen .....	175
<b>Abb. A3.</b> Makrokolonien im AR3110 $\Delta dgcM\Delta pdeR$ -Hintergrund und den entsprechenden 27 GGDEF/EAL-Trippl-Mutanten .....	176

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.</b> Liste der genutzten Bakterienstämme .....	58
<b>Tab. 2.</b> Liste der genutzten Bakteriophagen-Lysate .....	62
<b>Tab. 3.</b> Liste der genutzten Plasmide .....	62
<b>Tab. 4.</b> Liste der verwendeten Antibiotika .....	65
<b>Tab. 5.</b> Primer zur Herstellung von chromosomalen Knockout-Mutanten .....	68
<b>Tab. 6.</b> Primer zur Herstellung von chromosomalen Punktmutanten .....	70
<b>Tab. 7.</b> Primer zur Herstellung translationaler <i>lacZ</i> -Fusionen .....	71
<b>Tab. 8.</b> Primer für die BTH-Klonierung .....	71
<b>Tab. 9.</b> Primer zur Klonierung von Überexpressionsplasmiden .....	72
<b>Tab. 10.</b> Sonstige Primer .....	72
<b>Tab. 11.</b> Zusammensetzung von Acrylamid-Lösungen zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen einer Größe von 5x10 cm .....	80
<b>Tab. A1.</b> Überblick aller 29 von <i>E. coli</i> K-12 kodierten GGDEF-/EAL-Protein- kodierender Gene .....	173

---

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
A-Site	active Site – aktives Zentrum einer DGC/PDE
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BTH	Bacterial Two-Hybrid
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosin-Monophosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CF	Calcofluor
Cm	Chloramphenicol
CR	Congo-Rot
C-terminal	Carboxyl-terminal
DDM	dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
DGC	Diguanylatzyklase
DNA	deoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4,-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GT	Glycosyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
IM	Innere Zellmembran
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
I-Site	inhibitory Site – inhibitorisches Zentrum einer DGC
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani Medium
LBnoS	Luria-Bertani Medium ohne Salz
LMW	Low Molecular Weight Marker
M9	Minimalmedium 9
MCS	Multiple Cloning Site – multiple Klonierungsstelle

---

mRNA	messenger RNA
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nt	Nukleotide
N-terminal	Amino-terminal
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte gemessen bei x [nm]
OM	äußere Zellmembran
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-Galaktopyranosid
ORF	open reading frame - offenes Leseraster
PCR	polymerase chain reaction - Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PGA	Poly-N-acetylglucosamin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute – Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism - Punktmutation
Tab	Tabelle
Tet	Tetrazyklin
TMD	Transmembran-Domäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	Transformation Storage Solution
UDP-Glucose	Uridindiphosphat-Glucose
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

---

## Zusammenfassung

Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP stellt einen wichtigen Regulator bei der Kontrolle flagellarer Motilität, Virulenz und der Synthese einer extrazellulären Biofilmmatrix dar. Bakterielle Genome kodieren für eine Vielzahl von Enzymen, die an Synthese (Diguanylatzyklasen, DGCs) und Abbau (Phosphodiesterasen, PDEs) des Signalmoleküls beteiligt sind. Ähnlich hoch ist die Zahl c-di-GMP-bindender Effektoren und zellulärer Antworten, die durch diese reguliert werden. Aufgrund dieser Vielfalt c-di-GMP-auf und -abbauender Enzyme und entsprechender Effektoren und Targets etablierte sich die Theorie parallel existierender c-di-GMP-Regulationsmodule, die sich aus einzelnen DGCs, PDEs, Effektoren und Zielmolekülen zusammensetzen und spezifische Prozesse regulieren (Hengge, 2009). Die Synthese des Exopolysaccharids Cellulose ist einer dieser Prozesse, die durch c-di-GMP stimuliert werden. Während die Aktivierung der Cellulose-Synthese durch c-di-GMP bereits verstanden und damit Effektor und Zielmolekül bekannt sind, konnten dem Modul bisher keine spezifisch wirkenden DGCs und PDEs zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Cellulose-produzierender *Escherichia coli* K-12 Stamm etabliert, der es möglich macht, die c-di-GMP-regulierte Synthese dieses Exopolysaccharids näher zu untersuchen. Es wird gezeigt, dass ein DGC-PDE-Paar, welches sich aus DgcC (YaiC) und PdeK (YhjK) zusammensetzt, spezifisch auf die Cellulose-Synthese in Makrokolonie-Biofilmen wirkt und ein solches c-di-GMP-Modul bildet. Während DgcC bereits zuvor mit der Synthese von Cellulose assoziiert wurde, verdeutlicht diese Arbeit erstmals, dass PdeK dessen regulatorischen Antagonisten darstellt. Beide Proteine sind aktiv an der Umsetzung von c-di-GMP beteiligt und aufgrund von Protein-Interaktionen Teil eines Multi-Protein-Komplexes, der auch die Cellulose-Synthase-Untereinheiten BcsA und BcsB umfasst. Aufgrund dieser Co-Lokalisation können DgcC und PdeK die c-di-GMP-Konzentration in unmittelbarer Umgebung zum c-di-GMP-bindenden Effektor BcsA kontrollieren und im Falle einer Aktivierung der Cellulose-Synthese eine lokal ausreichend hohe Signalmolekül-Konzentration gewährleisten. DgcC-PdeK stellen das erste Regulationsmodul dar, welches durch lokalisierte Synthese und Abbau von c-di-GMP wirkt und dessen

---

Spezifität bezüglich der Cellulose-Synthese aufgrund multipler Protein-Interaktionen gewährleistet wird.

Im Sommer 2011 kam es in Mitteleuropa zu einem schweren Ausbruch von Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* O104:H4, in dessen Verlauf fast 4000 Menschen erkrankten und etwa 20% ein Hämolytisch-urämisches Syndrom entwickelten (Bielaszewska et al, 2011). Vergleichende Analysen mit nahe verwandten pathogenen *E. coli* zeigten, dass der Ausbruchstamm das Potential besitzt, hohe Mengen an c-di-GMP zu akkumulieren (T. L. Povolotsky, 2014, PhD Thesis). In dieser Arbeit wurden eine Temperatur-entkoppelte Regulation der CsgD-Synthese und das Auftreten von Subpopulationen mit noch weiter verstärkter CsgD-Produktion bei 37°C gezeigt. All dies begünstigt die Synthese amyloider Curli Fimbrien, die besonders in Abwesenheit von Cellulose proinflammatorisch wirken (Bian et al, 2000), was die Verbreitung von Shiga-Toxin im Blutstrom fördert. Dieses wiederum schädigt Nierengewebe und Darmepithel, was die Immunantwort des Wirtes weiter stimuliert. Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse legen nahe, dass genau diese einzigartige Kombination aus Shiga-Toxin-Produktion und Biofilm-assoziierten Eigenschaften – das Potential zur c-di-GMP-Akkumulation, verstärkte CsgD-Synthese bei 37°C und vor allem keine Cellulose-Produktion – möglicherweise zur erhöhten Virulenz dieses *E. coli* O104:H4 beitragen.

---

## Summary

The second messenger c-di-GMP represents an important regulator in the control of flagellar motility, virulence and the synthesis of an extracellular biofilm matrix. Bacterial genomes encode for multiple enzymes that synthesize (diguanylate cyclases, DGCs) and degrade (phosphodiesterases, PDEs) the signalling molecule. Equally high is the number of c-di-GMP-binding effectors and cellular outputs being regulated by them. Due to the multiplicity of c-di-GMP-forming and -degrading enzymes, specific effectors and targets, the theory of parallel existing c-di-GMP-regulation modules was established. Such a module consists of a DGC, a PDE, an effector and a target controlling a specific cellular output (Hengge, 2009). The synthesis of extracellular cellulose is one of those processes being stimulated by c-di-GMP. Whereas the activation of cellulose synthesis is well understood, and therefore effector and target molecule are known, so far no DGCs or PDEs have been associated with the cellulose-specific c-di-GMP-module.

Within the framework of this thesis a cellulose producing *Escherichia coli* K-12 strain was established and used to study c-di-GMP mediated regulation of cellulose synthesis. It is shown that the DGC-PDE-pair DgcC (YaiC) and PdeK (YhjK) acts specifically on the regulation of cellulose synthesis in macrocolony biofilms, thus forming a c-di-GMP module. While DgcC was described earlier as a cellulose activating DGC, it is demonstrated for the first time that PdeK is the regulating counterpart. Both proteins are enzymatically active concerning c-di-GMP metabolism and through protein-interactions part of a multi-enzyme-complex, which includes the cellulose synthase-subunits BcsA and BcsB. Due to this co-localisation DgcC and PdeK can control the c-di-GMP-concentration in close proximity to the c-di-GMP-binding cellulose-synthase BcsA and thus in the case of an activation of cellulose synthesis establish a high local concentration sufficient for activating cellulose synthesis. Therefore, DgcC-PdeK represents the first signalling module, which acts through local c-di-GMP-synthesis and -degradation and controls specifically cellulose because of multiple protein-interactions with the synthase-complex.

---

In summer 2011 a serious outbreak of shiga toxin producing *E. coli* O104:H4 occurred in Middle Europe. As a result nearly 4000 people were infected with approximately 20% developing haemolytic uraemic syndrome (Bielaszewska et al, 2011). Comparative analysis of closely related pathogenic *E. coli* demonstrated that the outbreak strain has the potential of accumulating high levels of c-di-GMP (T. L. Povolotsky, 2014, PhD Thesis). This study shows a temperature-independent regulation of CsgD-synthesis and the occurrence of subpopulations with even higher CsgD-production at 37°C. All this stimulates amyloid curli fiber synthesis that enhances inflammation especially in the absence of cellulose (Bian et al, 2000), which promotes shiga toxin circulation in the blood stream. This in turn causes tissue damage in kidney and intestine and thus further stimulates the host immune response. The results obtained in this study suggest that this unique combination of shiga toxin production and biofilm-associated properties – the potential of c-di-GMP accumulation, enhanced CsgD-synthesis at 37°C and especially no cellulose production – potentially contribute to the enhanced virulence of *E. coli* O104:H4.



---

# 1. Einleitung

## 1.1. Bakteriellles Wachstum und dessen Regulation in *Escherichia coli*

Obwohl im Labor Bakterien zumeist in Flüssigkultur herangezogen und studiert werden, entspricht das Wachstum in nährstoffreichen, gut durchmischten und gleichmäßig mit Sauerstoff versorgtem Medium nicht ihrer natürlichen Umgebung. Vielmehr sind Bakterien „draußen“ häufig in Form multizellulärer Biofilme organisiert, die auf Grenzflächen lokalisiert sind und sich durch Synthese und Ausscheidung von Matrixsubstanzen auszeichnen (Davey & O'Toole G, 2000; Hall-Stoodley et al, 2004; Watnick & Kolter, 2000). Diese aus Proteinen, Polysacchariden und mitunter auch extrazellulärer DNA bestehende Matrix dient der Anheftung an Substrat und benachbarte Zellen und gewährleistet zudem Schutz vor widrigen Umwelteinflüssen in Form einer mechanischen, chemischen und physikalischen Barriere (Chang et al, 2007; Davey & O'Toole G, 2000; Elasri & Miller, 1999; Gilbert et al, 1997).

Abhängig von der besiedelten Fläche lassen sich vier Arten von Biofilmen unterscheiden: i.) untergetauchte Biofilme, die auf einer festen, chemisch inerten Oberfläche siedeln und von einer flüssigen Phase überschichtet werden, die ihnen Nährstoffe und Sauerstoff liefert; ii.) Pellicle an Luft-Flüssigkeit-Grenzflächen, die Nährstoffe aus der flüssigen Phase beziehen und letztendlich Biofilme, die auf festem Untergrund lokalisiert sind und an eine Gasphase grenzen. Während die feste Phase bei iii.) Subaerialen Biofilmen hauptsächlich als Wachstumsuntergrund dient und nur Mikronährstoffe liefert, beziehen iv.) Makrokolonien den Großteil ihrer Nährstoffe aus der Oberfläche, auf der sie siedeln (Serra & Hengge, 2014).

### 1.1.1. Das Konzept vom „bakteriellen Lebensstil“

Auf Ebene der einzelnen Zelle lassen sich zwei physiologische Stadien klar voneinander unterscheiden. Am Beispiel von *Escherichia coli* sind dieses die Flagellenbasierte Motilität gegenüber der Ausscheidung einer Biofilm-Matrix. Mitunter wird in diesem Rahmen auch von unterschiedlichen Lebensstilen gesprochen, die in

---

Abhängigkeit der Wachstumsphase durchlaufen werden: das motile Einzelzell-Stadium und der multizelluläre, sessile Biofilm (Hengge, 2011; Lasa, 2006; Povolotsky & Hengge, 2012).

Bakterielles Wachstum - sprich die Zunahme der Zellzahl durch Zellteilung - lässt sich in einer komplexen, nährstoffreichen Flüssigkultur in drei Phasen unterteilen: exponentielle, post-exponentielle und stationäre Wachstumsphase (ausgenommen sind hier lag- oder „Gewöhnungs“- und Absterbe-Phase). Abzugrenzen sind diese Phasen voneinander durch Wachstumsgeschwindigkeit und Genexpression, die beide unter anderem durch Nährstoffressourcen kontrolliert werden. Bei besten Nährstoffbedingungen wächst *E. coli* K-12 in LB-Medium nur bis zu einer optischen Dichte (OD) von etwa 0,3 exponentiell mit einer Verdopplungszeit von etwa 20 min und nutzt verfügbare Ressourcen hauptsächlich zur Synthese von Ribosomen (Sezonov et al, 2007). Wenn mit Eintritt in die post-exponentielle Wachstumsphase die Konzentration von Nährstoffen langsam abnimmt, greifen zunehmend andere Faktoren in die Genexpression ein und es werden vermehrt Flagellen und Komponenten des Chemotaxis-Apparats gebildet (Ferenci, 2001; Soutourina et al, 1999). Sich weiter verringernde Nährstoffkonzentrationen leiten die stationäre Wachstumsphase ein, die in einer LB-Flüssigkultur einer OD ab etwa 2,5-3 entspricht (Sezonov et al, 2007). Während in den vorhergehenden Phasen Ribosomen- und Protein-Synthese, Zellteilung und Motilität im Vordergrund standen, wird nun vermehrt Augenmerk auf das Überleben unter widrigen Umweltbedingungen gelegt. Dies beinhaltet unter anderem multiple Stressresistenz und die Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten (Lange & Hengge-Aronis, 1991b). Am Beispiel *E. coli* können dies je nach Umweltbedingung amyloide Curli Fimbrien, Cellulose, Poly-N-acetylglucosamin (PGA) und Kolansäure sein (Hammar et al, 1995; Stevenson et al, 1996; Tschowri et al, 2009; Wang et al, 2004; Weber et al, 2005; Zogaj et al, 2001).

In *E. coli* sind morphologische Charakteristika von post-exponentieller bzw. stationärer Wachstumsphase Stäbchen-förmige, sich teilende und flagellierte Zellen gegenüber abgerundeten, Matrix-produzierenden, bei denen nur noch vereinzelt Zellteilung zu beobachten ist (Hengge, 2011). Unter Nutzung dieser Kennzeichen zeigen Serra et al., dass der *E. coli*-Makrokolonie-Biofilm zwei Schichten aufweist, von

denen die untere Medium-nahe Schicht postexponentiell-wachsenden Zellen entspricht, während sich in der oberen Stationär-Phasen-Zellen finden (Serra et al, 2013b). Gleichzeitig liegen in einer Übergangszone zwischen diesen Schichten beide Subpopulationen nebeneinander vor. Zu gleichen Ergebnissen bezüglich dieser Heterogenität kommen auch Studien, die sich mit anderen Biofilm-Formen oder Spezies befassen (DePas et al, 2013; Hung et al, 2013).

Die strikte Unterteilung in verschiedene Lebensstile und insbesondere der Begriff „Biofilm-Lebensstil“ können demnach als unvollständige Konzepte begriffen werden, da fälschlicherweise vorausgesetzt wird, jede Bakterienpopulation sei homogen und durchlaufe als Gemeinschaft beide Lebensstile (motile Einzelzelle vs. sessiler multizellulärer Biofilm) nacheinander. Vielmehr bilden sich in Abhängigkeit von Nährstoffgradienten oder dem Vorhandensein von z. B. Sauerstoff verschiedene Subpopulationen aus. Diese stellen Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen dar und lassen sich aufgrund physiologischer und morphologischer Charakteristika unterscheiden (Serra & Hengge, 2014; Serra et al, 2013b). Während sich der Biofilm somit *räumlich* in verschiedene Subpopulationen strukturiert, zeigen Flüssigkulturen mit homogenen Nährstoff-Bedingungen eher *temporal* auftretende Unterschiede. Diese Heterogenität geht auf variable Genexpression zurück, die in Antwort auf innere oder äußere Reize und Signale auf mehreren Ebenen reguliert werden kann.

### **1.1.2. Regulation durch Sigmafaktoren, Transkriptionsfaktoren und sekundäre Botenstoffe**

Umweltreize, die Wachstum und Physiologie beeinflussen, werden mittels Sensordomänen wahrgenommen und anhand eines komplex regulierten Netzwerks verarbeitet. Ergebnis dessen ist eine auf die jeweilige Umweltsituation zugeschnittene Veränderung der Genexpression, Protein-Aktivität oder Proteolyse. Teil dieser Signal-Kaskaden können Zwei-Komponenten-Systeme sein, die Veränderungen durch z.B. Liganden-Bindung an Sensordomänen erkennen. Die Assoziation mit Transmitter-Domänen gewährleistet die Signalweiterleitung auf eine zweite Komponente, den Response-Regulator, welcher über Sigmafaktoren, DNA-bindende Transkriptions-

---

Regulatoren oder sekundäre Botenstoffe Genexpression oder Enzymaktivitäten moduliert (Stock et al, 2000).

**Sigmafaktoren.** Die bakterielle RNA-Polymerase setzt sich nicht nur aus Untereinheiten zusammen, die für DNA-Bindung, Elongation und Termination der Transkription nötig sind. Vielmehr interagiert das Core-Enzym mit Sigmafaktoren, die der Erkennung spezifischer Promotorsequenzen und der Transkriptions-Initiation dienen. Verschiedene Sigmafaktoren erkennen in diesem Zusammenhang unterschiedliche DNA-Sequenzen und kontrollieren auf diese Weise verschiedenste Regulons (Gruber & Gross, 2003). In *E. coli* stellt RpoD ( $\sigma^{70}$ ) den vegetativen Sigmafaktor dar, der der Aufrechterhaltung des Grundstoffwechsels dient. Zusammen mit RpoD kompetitieren mehrere alternative Sigmafaktoren um Bindung an der RNA-Polymerase und können dabei durch spezifische Anti-Sigma-Faktoren inhibiert werden (Gruber & Gross, 2003; Helmann, 2011). Der Sigmafaktor der generellen Stressantwort, RpoS ( $\sigma^{38}$ ), wird auf Ebene der Transkription, Translation und Proteolyse streng kontrolliert und reguliert mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase oder in Antwort auf verschiedenste Reize etwa 10% des *E. coli*-Genoms (Hengge-Aronis, 2002; Hengge, 2011; Lange & Hengge-Aronis, 1994; Weber et al, 2005). Folge der RpoS-abhängigen Genexpression sind Inhibierung der Flagellen-Expression und -Bewegung, ein veränderter Metabolismus, die Ausbildung multipler Resistenzen gegenüber Umweltstressen und die Produktion und Ausscheidung extrazellulärer Matrixsubstanzen (Hengge, 2011). Neben RpoD und RpoS wird die Genexpression in *E. coli* von fünf weiteren Sigmafaktoren modifiziert, von denen einige als Antwort auf spezifische Reize wie Hitzeschock (RpoH), periplasmatischen Stress (RpoE) oder Stickstoffmangel (RpoN) agieren oder Genecluster zur Expression von Flagellen (FliA) oder zur Eisenaufnahme (FecI) regulieren (Ades et al, 2011; Braun & Mahren, 2005; Chevance & Hughes, 2008; Chilcott & Hughes, 2000; Helmann, 2011; Lim & Gross, 2011; Merrick, 1993).

**Transkriptionsfaktoren.** Eine weitere Klasse von Regulatoren stellen DNA-bindende Transkriptionsfaktoren dar, die meist als Dimere oder Multimere die Transkription

---

positiv oder negativ beeinflussen. So können sie die RNA-Polymerase zum Promotor rekrutieren bzw. dessen Affinität für das Enzym erhöhen und dadurch die Transkription positiv regulieren oder aber die Interaktion von RNA-Polymerase und DNA behindern und damit die Transkriptions-Initiation oder –Elongation unterbinden (Browning & Busby, 2004; Lee et al, 2012). Interaktion mit Liganden oder Proteinen bzw. Modifikation durch z. B. Phosphorylierung kann die DNA-Bindung initiieren (CRP), ändern (FleQ, MlrA) oder inhibieren (LacI) und damit die Transkription zusätzlich modifizieren (Baraquet et al, 2012; Botsford & Harman, 1992; Brown et al, 2001).

**Sekundäre Botenstoffe.** Neben Sigmafaktoren und Transkriptions-Regulatoren sind auch niedermolekulare Signalmoleküle an der Genexpression beteiligt. Diese können durch Bindung an Transkriptions-Regulatoren deren DNA-Affinität modulieren, Protein-Interaktionen stabilisieren oder aber Protein-Aktivitäten regulieren und damit post-translational wirken. Einige Nukleotid-basierte Signalmoleküle werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Das durch Adenylatzyklasen gebildete **cAMP** reguliert die Expression verschiedenster Stoffwechsel-Gene in Abhängigkeit der vorherrschenden Kohlenstoffquelle. Sinkt die Konzentration der bevorzugten Kohlenstoffquelle, steigt der zelluläre cAMP-Spiegel an. Durch Bindung an das cAMP-Rezeptor-Protein (CRP) wird die Expression von Genen für die Nutzung alternativer Kohlenstoff-Quellen stimuliert (Botsford & Harman, 1992). Der cAMP-CRP-Komplex reguliert neben zahlreichen Stoffwechsel-Komponenten auch die Expression des *flhDC*-Operons und damit die Flagellen-Synthese positiv, reprimiert jedoch die *rpoS*-Expression (Lange & Hengge-Aronis, 1994; Soutourina et al, 1999).

Sobald mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase auch die Konzentration an Aminosäuren abnimmt oder einem Mangel an Kohlenstoff, Stickstoff oder Phosphat vorherrscht, akkumuliert **(p)ppGpp** in der Zelle, welches durch RelA und SpoT synthetisiert wird. Das Signalmolekül bindet die RNA-Polymerase und stimuliert die Elongation bzw. Stabilität der *rpoS*-mRNA und unterstützt die Bindung alternativer

Sigmafaktoren an die RNA-Polymerase (Jishage et al, 2002; Lange et al, 1995; Magnusson et al, 2005).

**c-di-AMP**, welches von DAC-Domänen-Proteinen synthetisiert wird, reguliert besonders in grampositiven Bakterien unter anderem den Fettsäuremetabolismus, Virulenz und Überleben in Wirtszellen, die Zellwand-Homöostase, das Erkennen von DNA-Schäden und Synthese und Aktivität von Kaliumtransportern (Corrigan & Grundling, 2013). Während die Deletion von Adenylatzyklasen bzw. RelA/SpoT zumeist nur zu Einschränkungen im bakteriellen Wachstum führt und cAMP und ppGpp damit nicht essentiell sind, wirkt sich die Mutation von c-di-AMP-synthetisierenden Enzymen letal aus (Glass et al, 2006).

Ein noch weitgehend unbekanntes Signalmolekül stellt **c-AMP-GMP** dar, welches in *Vibrio cholerae* die Chemotaxis und in *Geobacter*-Spezies mittels Riboswitches die Verwertung von Eisenoxid als Elektronenakzeptor reguliert (Davies et al, 2012; Nelson et al, 2015).

Als zentrales Signalmolekül zur Regulation flagellarer Motilität, Biofilm-Bildung, Virulenz und der Steuerung des Zellzyklus rückte **c-di-GMP** in den letzten Jahren in den Fokus mikrobiologischer Forschung und wird in Kapitel 1.2. eingehender behandelt.

## 1.2. Das Signalmolekül zyklisches di-GMP

Erstmals beschrieben wurde bis-(3',5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) vor fast 30 Jahren, als Ross et al. das intrazelluläre Signalmolekül als Aktivator der Cellulose-Synthase in *Acetobacter xylinum* (heute: *Gluconacetobacter* bzw. *Komagataeibacter*) identifizierten (Ross et al, 1987). Darüber hinaus stimulieren hohe zelluläre c-di-GMP-Konzentrationen die Produktion zahlreicher anderer Exopolysaccharide (vgl. Kapitel 1.3.) und Proteine (amyloide Curli Fimbrien, Typ-III-/Typ-IV- und CUP-Fimbrien) die Bestandteil der extrazellulären Matrix von Biofilmen sind (Hengge, 2009; Liang, 2015; Römling et al, 2013). Gegensätzliche Wirkung hat das Signalmolekül auf flagellare und Pili-basierte Motilität (Baraquet et al, 2012; Boehm et al, 2010; Skotnicka et al, 2015). Im Rahmen der akuten Virulenz unterbindet c-di-GMP

die Expression von Virulenzfaktoren (Tamayo et al, 2007), während chronische Virulenz stimuliert wird, da hier durch Biofilmbildung im Wirt ein permanentes Erreger-Reservoir geschaffen werden kann (Jenal & Malone, 2006; Parsek & Singh, 2003). Ferner ist c-di-GMP in die Synthese verschiedenster Sekundär-Metabolite wie Antibiotika in *Streptomyces*, Phenazine in *Pseudomonas* oder Pigmente in *Myxococcus* involviert, über deren Regulation Liang einen umfassenderen Überblick gibt (Liang, 2015).

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist bekannt, dass die Mehrzahl aller bisher sequenzierten Genome der *Eubacteria* für c-di-GMP-metabolisierende Proteine kodiert (Galperin et al, 2001). Jüngste Publikationen zeigen zudem, dass c-di-GMP in *Dictyostelium discoideum* die Zell-Differenzierung reguliert und von eukaryotischen Makrophagen über STING-Rezeptoren als Indikator für bakterielle Infektionen wahrgenommen werden kann und damit selbst über das Bakterienreich hinaus ein wichtiges Signalmolekül darstellt (Burdette et al, 2011; Chen & Schaap, 2015; Schaap, 2013).

### 1.2.1. Synthese und Abbau von c-di-GMP

Die Verknüpfung zweier GTP-Moleküle durch Phosphodiester-Bindungen zu c-di-GMP wird von Diguanylatzyklasen (DGCs) katalysiert, die sich durch 170 Aminosäuren lange GGDEF-Domänen auszeichnen (Galperin et al, 2001; Ryjenkov et al, 2005; Simm et al, 2004). Namensgebend ist hier das konservierte Aminosäuremotiv Gly-Gly-Asp-Glu-Phe, welches das katalytisch aktive Zentrum (A-Site) darstellt und der GTP-Bindung dient. DGCs agieren als Dimere, wobei jedes Monomer ein GTP bindet. Die Röntgenkristallstruktur von PleD, einem Response-Regulator von *Caulobacter crescentus*, zeigt, dass der Kontakt durch das Produkt c-di-GMP vermittelt wird und direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen den GGDEF-Domänen eine untergeordnete Rolle spielen (Chan et al, 2004). Vielmehr interagieren zusätzliche Protein-Domänen miteinander und tragen so in Abhängigkeit bestimmter Umweltreize zur GGDEF-GGDEF-Dimerisierung und damit verbundener DGC-Aktivität bei (Schirmer & Jenal, 2009). Ein weiteres Charakteristikum vieler GGDEF-Domänen ist ihr konserviertes RxxD-Motiv (x steht für jede beliebige Aminosäure), einer c-di-GMP-

Bindestelle fünf Aminosäuren stromaufwärts der A-Site. Die Bindung von c-di-GMP an dieser I-Site wirkt auto-inhibierend auf die DGC-Aktivität des Enzyms durch Immobilisation der GGDEF-Domäne (Chan et al, 2004).

Der Abbau von c-di-GMP über das lineare Zwischenprodukt 5'pGpG zu GMP wird von Phosphodiesterasen (PDEs) katalysiert, die EAL- oder HD-GYP-Domänen mit einer Länge von etwa 250 bzw. 170 Aminosäuren aufweisen (Christen et al, 2005; Galperin et al, 2001; Ryan et al, 2006; Schmidt et al, 2005; Simm et al, 2004). Obwohl beide Domänen c-di-GMP degradieren, sind sie nicht homolog zueinander und gehen vielmehr auf konvergente Entwicklung zurück. Analog zu GGDEF-Domänen geht auch hier die Namensgebung auf konservierte und für die PDE-Aktivität essentielle Aminosäuren zurück: Glu-Ala-Leu-x-Arg (alternativ Val/Ile statt Ala) bzw. His-Asp und Gly-Tyr-Pro. Im Falle der HD-GYP-Domänen sind die Aminosäurereste ‚HD‘ und ‚GYP‘ durch etwa 60 Aminosäuren voneinander getrennt (Galperin et al, 2001). Während HD-GYP-Domänen-Proteine den zweistufigen Abbau über pGpG zu GMP katalysieren, vermitteln EAL-Domänen-Proteine häufig nur die Hydrolyse zu 5'pGpG (PDE-A Aktivität), während dieses nur von wenigen EAL-Domänen weiter zu GMP abgebaut werden kann (PDE-B Aktivität; z. B. PdeH von *E. coli*) (Christen et al, 2005; Weber et al, 2006). Laut zweier erst kürzlich veröffentlichter Studien stellt Oligoribonuklease (Orn) als pGpG-degradierendes Enzym in *P. aeruginosa* den abschließenden Schritt im c-di-GMP-Metabolismus dar (Cohen et al, 2015; Orr et al, 2015).

Enzymatische Aktivitäten von DGCs und PDEs sind abhängig von divalenten Metall-Ionen wie  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ , deren Bindestellen in GGDEF-/EAL- und HD-GYP-Domänen ebenfalls hoch konserviert sind (Aravind & Koonin, 1998; Chan et al, 2004; Christen et al, 2005; Rao et al, 2008; Ryan et al, 2006; Schirmer & Jenal, 2009).

Da GGDEF- und EAL-/HD-GYP-Domänen Synthese bzw. Abbau von c-di-GMP katalysieren, erscheint ihr gleichzeitiges Vorhandensein innerhalb eines Proteins ungewöhnlich. Dennoch sind in bakteriellen Genomen eine Vielzahl von Proteinen zu finden, die sich aus GGDEF-Domänen und EAL- bzw. HD-GYP-Domänen zusammensetzten (Galperin, 2004; Galperin et al, 1999; Galperin et al, 2001). Meist liegt eine der Domänen stark degeneriert und damit inaktiv vor, kann aber regulatorische



---

Wirkung auf die jeweils andere haben, wie am Beispiel von PdeA in *C. crescentus* deutlich wird: GTP-Bindung am degenerierten GGDEF-Motiv erhöht die Substrataffinität der C-terminalen EAL-Domäne und damit den Abbau von c-di-GMP (Christen et al, 2005). Sofern GGDEF- und EAL/HD-GYP-Domäne konserviert sind und das Protein dadurch bifunktional aktiv ist, bedarf es einer strengen Kontrolle beider Domänen. So werden DGC- und PDE-Aktivität der Hybrid-Proteine Cph2 in *Synechocystis sp.* oder BphG1 in *Rhodobacter sphaeroides* photosensorisch reguliert und damit Lichtverhältnisse der Umgebung in die c-di-GMP-Signalkaskade eingebunden (Savakis et al, 2012; Tarutina et al, 2006).

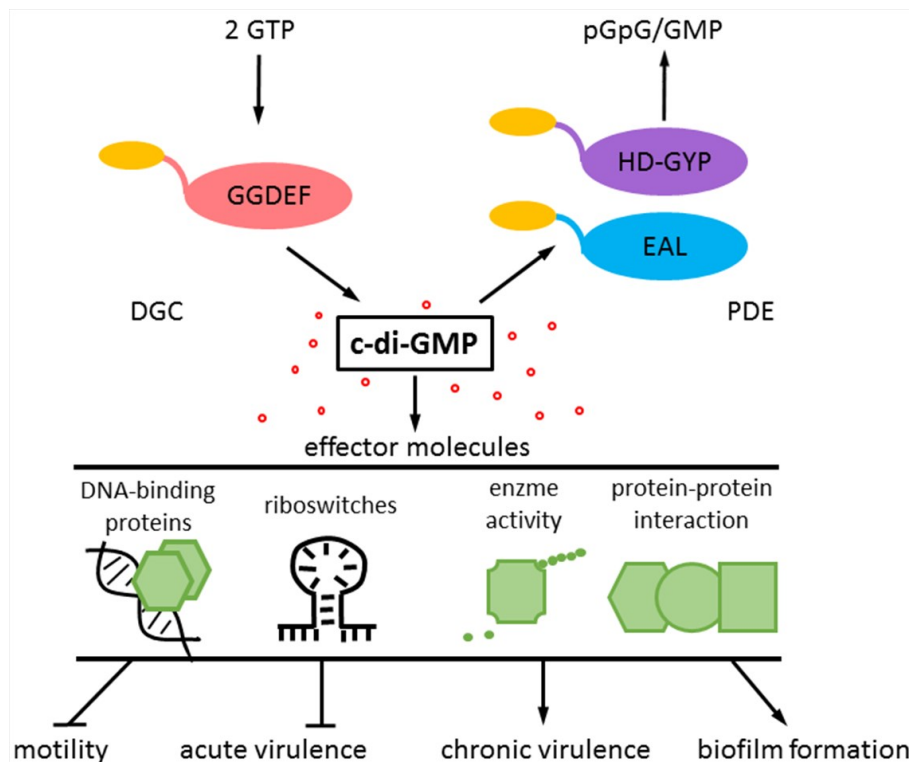
GGDEF-/EAL- und HD-GYP-Domänen sind meist Teil von Multi-Domänen-Proteinen, die neben den c-di-GMP-assoziierten Bereich über eine bis mehrere N-terminale Sensordomänen verfügen (Galperin, 2004). Diese Kopplung von Input- (Sensor) und Output-Domäne (GGDEF/EAL/HD-GYP) ermöglicht es, den c-di-GMP-Spiegel in Antwort auf intra- oder extrazelluläre Umweltsignale gezielt zu modifizieren. Als cytoplasmatische Sensoren c-di-GMP-assoziiierter Proteine sind bisher Phosphoreceiver-Domänen (REC), Domänen zur Bindung von Nukleotiden (GAF) oder anderen niedermolekularen Liganden (PAS) und DNA-bindende Domänen (LuxR-like) beschrieben (Ho et al, 2000; Hoch, 2000; Ponting & Aravind, 1997). Membran-assoziierte Sensordomänen (MASE), die sich aus mehreren Membran-Helices zusammensetzen, periplasmatische Ligand-Binde-Domänen (CACHE, CHASE & GAPES) oder zur Bildung von Disulfidbrücken befähigte Domänen (CSS) ermöglichen es, Signale außerhalb des Cytoplasmas wahrzunehmen (Anantharaman & Aravind, 2000; Hengge et al, 2015; Nikolskaya et al, 2003). Die intramolekulare Signalweiterleitung von z. B. periplasmatischer Sensordomäne zur cytoplasmatischen Output-Domäne in Multi-Domänen-Proteinen kann beispielsweise durch HAMP-Domänen und durch sie induzierte Konformationsänderungen oder Bildung von Protein-Komplexen gewährleistet werden (Aravind & Ponting, 1999).

---

### 1.2.2. Generelle Prinzipien der c-di-GMP-vermittelten Signaltransduktion

Bakterielle Genome kodieren für eine Vielzahl von GGDEF-/EAL- und HD-GYP-Domänen-Proteine. So besitzen *Borrelia*-Spezies nur jeweils ein GGDEF-, EAL- bzw. HD-GYP-Domänen-Protein, während *Actinoplanes* sp. SE50/110 über 115 Leserahmen für c-di-GMP-metabolisierende Enzyme verfügt ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete\\_Genomes/c-di-GMP.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/c-di-GMP.html)). Ebenso vielfältig ist der Umfang an c-di-GMP-bindenden Effektor-Molekülen (Kapitel 1.2.3.). In dieser Multiplizität äußern sich die Unterschiede zur bakteriellen (p)ppGpp- und cAMP-abhängigen Signaltransduktion, deren synthetisierende und degradierende Enzyme meist nur in geringer Zahl zu finden sind und die nur wenige Effektoren regulieren (Pesavento & Hengge, 2009).

Obwohl alle DGCs und PDEs an der Umsetzung des gleichen Signalmoleküls beteiligt sind, geht Deletion oder Überexpression einzelner DGC- oder PDE-Leserahmen oft mit sehr spezifischen Phänotypen einher und beeinflusst nicht alle von c-di-GMP kontrollierten Vorgänge respektive den zellulären c-di-GMP-Spiegel in vergleichbarem Ausmaß (Barnhart et al, 2013; Guyon et al, 2014; Kader et al, 2006; Simm et al, 2005; Simm et al, 2007; Solano et al, 2009; Tal et al, 1998). Gleichzeitig ist die Expression einiger DGCs und PDEs abhängig von der Aktivität anderer, was hierarchisch verschiedene Stufen der Regulation vermuten lässt (Kader et al, 2006). Dies spricht dafür, dass nicht alle Proteine gleichermaßen an der Regulation eines einzigen c-di-GMP-Pools beteiligt sind. Im Zuge dessen hat sich die Hypothese multipler, parallel vorkommender c-di-GMP-Regulationsmodule etabliert. Diese setzen sich aus DGC und PDE, die in Abhängigkeit ihrer Sensordomänen die Konzentration des Signalmoleküls modulieren, einem c-di-GMP-bindenden Effektor und dem Zielmolekül zusammen, das durch Interaktion mit dem Effektor die zelluläre Antwort gibt (Povolotsky & Hengge, 2012)(Abb. 1). Diese Antwort kann sich in Form veränderter Genexpression, mRNA-Stabilität und -Prozessierung, modifizierter Enzymaktivität oder der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen äußern (Jenal & Malone, 2006).



**Abb.1. Synthese, Funktion und Abbau von c-di-GMP.** Das Signalmolekül c-di-GMP wird von Diguanylatzyklasen (DGCs) synthetisiert und von Phosphodiesterasen (PDEs) abgebaut. Für die enzymatische Aktivität nötige Domänen (GGDEF/EAL/HD-GYP; rot/blau/violett) sind in beiden Protein-Gruppen hoch konserviert und häufig mit N-terminalen Sensor-Domänen (gelb) fusioniert. Durch Bindung an verschiedenste Rezeptormoleküle (DNA-bindende Transkriptionsregulatoren, mRNA-Riboswitches, Enzyme, Multi-Protein-Komplexe) reguliert c-di-GMP Motilität, Virulenz und Biofilmbildung.

Um Spezifität bezüglich des regulierten Zielmoleküls und damit des phänotypischen Outputs zu garantieren und gleichzeitig die Kreuzkommunikationen verschiedener DGCs und PDEs zu verhindern, ist eine Sequestrierung einzelner Module nötig (Hengge, 2009; Jenal & Malone, 2006; Povolotsky & Hengge, 2012). Diese kann temporal erfolgen, indem in Antwort auf extra- oder intrazelluläre Signale und damit einhergehender Kontrolle von Expression, Enzymaktivität oder proteolytischem Abbau nicht alle DGCs und PDEs zum gleichen Zeitpunkt vorhanden sind bzw. aktiv vorliegen (Duerig et al, 2009; Galperin, 2004; Kirillina et al, 2004; Sommerfeldt et al, 2009; Townsley & Yildiz, 2015; Weber et al, 2006). Im Rahmen der Regulation von Flagellenbewegung und Matrixsynthese in *E. coli* wird diese temporale Sequestrierung durch aufeinander abgestimmte Expression einzelner Komponenten eines c-di-GMP-

---

Moduls gewährleistet: so werden in der post-exponentiellen Phase vornehmlich PDEs exprimiert, die den zur Motilität nötigen geringen c-di-GMP-Spiegel garantieren, während mit Eintritt in die stationäre Phase die vermehrte Expression von DGCs und damit einhergehend die durch c-di-GMP stimulierte Synthese von Matrixsubstanzen und die Inhibierung der Flagellenrotation zu beobachten sind (Pesavento et al, 2008; Sommerfeldt et al, 2009; Weber et al, 2005)(vgl. Kapitel 1.2.4). Darüber hinaus kann selbst in der Stationärphase eine zeitlich versetzte Expression von DGCs beobachtet werden, die verschiedenen c-di-GMP-Regulationsmodulen zuzuordnen sind und ihrerseits die Expression weiterer c-di-GMP-assoziiierter Gene regulieren (Sommerfeldt et al, 2009; Weber et al, 2006).

Eine weitere Möglichkeit stellt die räumliche respektive funktionale Sequestrierung dar, bei der zum gleichen Zeitpunkt in der Zelle agierende Module physisch voneinander getrennt vorliegen, beispielsweise durch Integration in die Zellmembran oder Lokalisation am Zellpol (Duerig et al, 2009; Hengge, 2009; Jenal & Malone, 2006; Kader et al, 2006; Ross et al, 1991; Weber et al, 2006). Co-Lokalisation aller Komponenten eines Moduls bspw. durch Bildung von Multi-Protein-Komplexen gewährleistet hier die spezifische Wirkung einer lokal regulierten c-di-GMP-Konzentration auf Effektor und Zielmolekül (Hengge, 2009). Aufgrund der schnellen Diffusion von c-di-GMP und fehlender zellulärer Strukturen, die in bakteriellen Zellen die Ausbildung von Mikrokompartimenten ermöglichen, kann diese lokale Sequestrierung nur durch Aufbau eines lokalen Gradienten wirken, nicht aber durch voneinander abgegrenzte c-di-GMP-Pools unterschiedlicher Konzentrationen (Mills et al, 2011). Obwohl Interaktionen zwischen DGCs, PDEs und Effektoren anhand mehrerer Beispiele belegt werden können (Bobrov et al, 2008; Duerig et al, 2009; Kulasekara et al, 2013; Lee et al, 2007; Merighi et al, 2007), mangelt es bisher an konkreten Beispielen für ein Regulations-Modul, welches durch Modulation eines lokalen c-di-GMP-Gradienten spezifisch auf Effektor und Zielmolekül wirkt. Unabhängig von der Generierung eines solchen Gradienten können DGCs und PDEs auch über direkte Protein-Interaktionen auf den Effektor wirken, ohne dass es einer c-di-GMP-Bindung bedarf. Ein in der Matrixsynthese von *E. coli* involviertes Modul

dieser Art stellt DgcM-PdeR dar (Lindenberg et al, 2013; Weber et al, 2006), dessen Wirkmechanismus in Kapitel 1.2.4 näher beschrieben wird.

Während phänotypische Outputs zahlreicher DGCs und PDEs bereits beschrieben sind, mangelt es bisher an Kenntnissen der sie aktivierenden Input-Reize. So zeigen Mills et al. und Amarasinghe et al. in *Salmonella* Typhimurium mittels umfassender Screenings Änderungen der c-di-GMP-Spiegel in Antwort auf ausgewählte Komponenten wie IgA oder L-Arginin und die damit einhergehende verstärkte Synthese von Matrixsubstanzen (Amarasinghe et al, 2013; Mills et al, 2015). Gleichzeitig werden auch Wirts-spezifische Signale, photosensorische Reize, Antibiotika, Sauerstoff, Stickstoffmonoxid, Quorum-Sensing-Systeme und die Ausbildung von Protein-Interaktionen als c-di-GMP-Modulatoren diskutiert (Deng et al, 2012; Hoffman et al, 2005; Koestler & Waters, 2014; Lindenberg et al, 2013; Liu et al, 2012; Malone et al, 2012; Savakis et al, 2012; Tarutina et al, 2006; Tuckerman et al, 2011). Es bleibt zu erwarten, dass sich in den kommenden Jahren weitere Arbeiten mit der Identifizierung dieser Art von Signalen befassen werden. Ebenso verhält es sich mit Effektormolekülen, die in Abhängigkeit von c-di-GMP-Bindung oder aufgrund von Interaktion mit DGC bzw. PDE das Zielmolekül und damit die phänotypische Antwort regulieren und im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

### 1.2.3. c-di-GMP-bindende Effektoren

c-di-GMP greift auf Ebene der Transkription und Translation oder post-translational durch Regulation von Enzymaktivität bzw. Ausbildung von Protein-Komplexen in zahlreiche Prozesse ein (Abb. 1). Die Vielfältigkeit phänotypischer Outputs wird dabei vor allem durch eine breite Palette an Effektor-Molekülen gewährleistet (Boyd & O'Toole, 2012; Hengge, 2009; Ryan et al, 2012).

Durch Bindung von c-di-GMP an Transkriptions-Regulatoren kann deren DNA-Interaktion auf unterschiedliche Weise modifiziert werden. Die DNA-Bindung kann zum einen stimuliert werden, wie es für Bcam1349 in *Burkholderia cenocepacia* und den Repressor BldD in *Streptomyces* gezeigt wurde, die die Synthese verschiedener Exopolysaccharide induzieren bzw. die Expression von Sporulations-Genen während

---

der vegetativen Wachstums-Phase unterbinden (Fazli et al, 2012; Fazli et al, 2011; Tschowri et al, 2014). Konträr zu Bcam1349 und BldD wird durch c-di-GMP-Bindung an den CRP-ähnlichen Repressor Clp in *Xanthomonas* dessen Interaktion mit der DNA aufgehoben und damit Virulenz-Gene de-reprimiert (Chin et al, 2010). FleQ stimuliert in *Pseudomonas aeruginosa* nicht nur die Flagellen-Expression, sondern reprimiert die Transkription der *pel*-und *psl*-Operone, welche für die Synthese-Maschinerie der gleichnamigen Exopolysaccharide kodieren. Durch c-di-GMP-Bindung und Interaktion mit FleN wird diese Repression aufgehoben, *pelA-G* bzw. *pslABCD* exprimiert, die Transkription Flagellen-assoziiierter Gene jedoch unterbunden (Baraquet et al, 2012; Hickman & Harwood, 2008).

c-di-GMP-Bindung an mRNAs ermöglicht die Regulation auf Ebene der Translation und mRNA-Stabilität (Hengge, 2010). So konnte durch bioinformatische Analysen ein hoch konserviertes „GEMM“-Motiv (Genes for Environment, Membranes and Motility) in unmittelbarer Nähe vieler DGC- bzw. PDE-Leserahmen und anderer c-di-GMP-regulierter Gene identifiziert werden (Smith et al, 2009; Sudarsan et al, 2008). Am Beispiel von *V. cholerae* zeigen Sudarsan und Mitarbeiter, dass c-di-GMP-Bindung an GEMM-RNAs die Ausbildung von Sekundärstrukturen ändert und damit die Translation moduliert. Abweichend von diesen Klasse-I-Riboswitches werden Klasse-II-Riboswitches von sich selbst spleißenden Introns reguliert. In *Clostridium difficile* induziert c-di-GMP-Bindung an die CD3246-mRNA strukturelle Umbildungen, die zu abweichender RNA-Prozessierung führen und eine alternative Ribosomen-Bindestellen in unmittelbarer Nähe zum Startcodon generieren, die sich ohne Spleißen des Introns etwa 600 bp stromaufwärts des ATGs befindet (Lee et al, 2010).

Die Kontrolle der Enzymaktivität durch c-di-GMP-Bindung ist neben der Produkthemmung in DGCs auch in anderen Proteinen zu beobachten. So wurden als erste c-di-GMP-bindende Effektorproteine PilZ-Domänen beschrieben und nach dem solitär vorkommenden PilZ in *P. aeruginosa* benannt (Amikam & Galperin, 2006; Ryjenkov et al, 2006). Die Bindung von c-di-GMP ist hier von zwei hoch konservierten Motiven, (Q/E)RRxxxR und D/NxSxxG, abhängig (Benach et al, 2007). Im Rahmen der Exopolysaccharid-Synthese reguliert c-di-GMP-Bindung an PilZ-Domänen die enzymatische Aktivität der Synthase (Merighi et al, 2007; Morgan et al, 2014)(vgl.

Kapitel 1.3.). Diese kann zusammen mit der PilZ-Domäne Teil eines Multi-Domänen-Proteins sein (vgl. BcsA) oder durch Protein-Interaktion aktiviert werden (vgl. Alg8-Alg44). Auf die c-di-GMP-abhängige Modulation von Enzymaktivitäten bzw. Protein-Interaktionen im Rahmen der Exopolysaccharid-Synthese wird in Kapitel 1.3. genauer eingegangen. Neben BcsA kodiert *E. coli* für ein zweites PilZ-Domänen-Protein, YcgR, welches in Abhängigkeit von c-di-GMP mit dem flagellaren Basalkörper interagiert und die Flagellen-Rotation inhibiert (Amikam & Galperin, 2006; Boehm et al, 2010; Ryjenkov et al, 2006).

Durch c-di-GMP-Bindung an degenerierten EAL/HD-GYP-Domänen oder an I-Sites inaktiver GGDEF-Domänen können enzymatisch inaktive Proteine als Effektoren dienen, statt aktiver Teil von c-di-GMP-Synthese und -Abbau zu sein (Jenal & Malone, 2006). Beispiele für degenerierte EAL-Domänen-Proteine stellen FimX in *P. aeruginosa* und LapD in *P. fluorescens* dar, die Typ-IV-abhängige Twitching-Motilität bzw. eine periplasmatische Protease und damit das Adhäsion LapA auf der Zelloberfläche regulieren (Boyd & O'Toole, 2012; Kazmierczak et al, 2006; Newell et al, 2009; Qi et al, 2011). In die Regulation des Zellzyklus in *C. crescentus* greift das Signalmolekül über das degenerierte GGDEF-Domänen-Protein PopA ein, welches in Folge von c-di-GMP-Bindung zusammen mit dem Mediator-Protein RcdA und dem Zellzyklus-Regulator CtrA an den Pol der Stämmchen-Zelle sequestriert, wo letzterer abgebaut wird und die Zelle erneut in den S-Phase eintreten kann (Duerig et al, 2009).

Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren weitere Effektoren identifiziert, die sich durch andere c-di-GMP-bindende Motive bzw. Wirkmechanismen auszeichnen (Fang et al, 2014; Ma et al, 2011). Gerade diese Vielfalt an Effektoren und die wachsende Zahl an Möglichkeiten zur Identifizierung dieser lassen erwarten, dass in den nächsten Jahren noch weitere c-di-GMP-bindende Proteine gefunden und ihre Regulationsmechanismen aufgeklärt werden.

#### **1.2.4. Die c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion in *E. coli***

Die klassischen kommensalen *E. coli* K-12-Stämme MG1655 und W3110 kodieren für 29 Proteine mit c-di-GMP-assoziierten-Domänen, von denen 12 eine GGDEF-Domäne

tragen, neun eine EAL-Domäne und acht setzen sich aus beiden Domänen zusammen (Hengge, 2009; Hengge et al, 2015). Basierend auf den Aminosäuresequenzen der zur Katalyse notwendigen Motive sind 12 Proteine DGCs, 13 PDEs und vier verfügen über stark degenerierte Motive, die Synthese bzw. Abbau von c-di-GMP nicht erlauben, was im Zuge einer neuen Nomenklatur berücksichtigt wurde (Hengge et al, 2015) (vgl. Tab. A1). Im Folgenden werden beide Bezeichnungen bei erster Erwähnung parallel genannt. Durch *in silico* Analysen wurden darüber hinaus in pathogenen *E. coli*-Stämmen sechs weitere GGDEF-/EAL-kodierende Gene identifiziert (Povolotsky & Hengge, 2015; Richter et al, 2014). Die c-di-GMP-vermittelte Kontrolle von Flagellen-Bewegung und Synthese extrazellulärer Matrixsubstanzen wird durch zwei c-di-GMP-Module – DgcE-PdeH und DgcM-PdeR – reguliert, deren Komponenten selbst einer strengen Kontrolle unterliegen.

Als RpoD-abhängiger Transkriptionsfaktor stellt der FlhDC-Komplex die oberste Stufe einer streng regulierten Gen-Kaskade dar, die während der post-exponentiellen Wachstumsphase in der Synthese von Flagellen und dem Chemotaxis-System mündet (Chevance & Hughes, 2008; Chilcott & Hughes, 2000)(blau unterlegter Bereich Abb. 2). Neben Strukturgenen zum Aufbau dieser Komponenten stimuliert FlhDC die Expression von *pdeH* (*yhjH*) und *ycgR* („flagellare Bremse“, vgl. Kapitel 1.2.3). Zusätzlich zu PdeH überwiegt in logarithmischer und post-exponentieller Phase auch die Expression anderer PDEs, aufgrund dessen c-di-GMP-Konzentrationen in wachsenden Zellen vergleichsweise niedrig sind (Christen et al, 2005; Sommerfeldt et al, 2009)(Skopp & Hengge, unveröffentlichte Daten). Die RpoS-vermittelte Genexpression wird in dieser Wachstumsphase aufgrund proteolytischen RpoS-Abbaus, Sigma-Faktor-Kompetition um die RNA-Polymerase und durch den FlhDC-abhängigen Repressor FliZ reprimiert (Becker et al, 1999; Lange & Hengge-Aronis, 1994; Pesavento et al, 2008; Pesavento & Hengge, 2012).

Mit Eintritt in die stationäre Phase und damit einhergehender RpoS-abhängiger Expression von DGCs (DgcQ [YedQ] und vornehmlich DgcE [YegE]) steigt der c-di-GMP-Spiegel an und inhibiert durch Bindung an YcgR die Flagellen-Rotation (Boehm et al, 2010; Sommerfeldt et al, 2009; Weber et al, 2006)(rot unterlegter Bereich Abb. 2). Aufgrund inverser Regulation von RpoD- und RpoS-vermittelter Genexpression

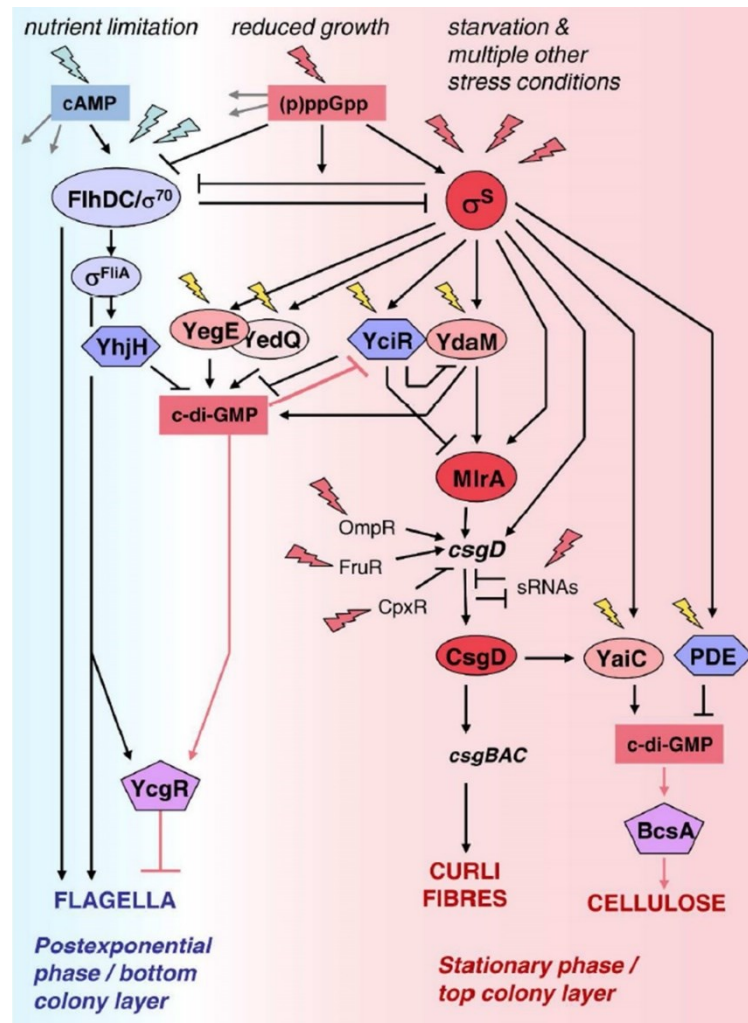


---

nimmt die Synthese FlhDC-abhängiger Genprodukte gleichzeitig ab bzw. werden diese proteolytisch abgebaut (Barembuch & Hengge, 2007; Pesavento et al, 2008; Pesavento & Hengge, 2012).

Auch die Synthese des MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktors MlrA, von DgcM (YdaM) und des Trigger-Enzyms PdeR (YciR) werden RpoS-abhängig stimuliert (Sommerfeldt et al, 2009; Weber et al, 2006). Trigger-Enzyme sind dual wirksam und regulieren in Abhängigkeit zur Substrat-Verfügbarkeit die Genexpression (Commichau & Stülke, 2008). Dies kann in Abwesenheit vom Substrat durch Bindung von DNA bzw. RNA oder durch Interaktion mit Transkriptionsregulatoren geschehen. PdeR besitzt neben seiner PDE-Aktivität die Fähigkeit, mit dem Protein-Komplex aus DgcM und MlrA zu interagieren und dessen Funktion zu inhibieren. Durch DgcE-PdeH generiertes c-di-GMP stimuliert die PDE-Aktivität von PdeR und es entlässt den DgcM-MlrA-Komplex (Lindenberg et al, 2013). Es kommt zur Expression des LuxR-ähnlichen Biofilm-Regulators CsgD, der seinerseits die Expression von amyloiden Curli Fimbrien (*csgBAC*-Operon) und von *dgcC* (*yaiC*) stimuliert (Brombacher et al, 2003; Hammar et al, 1995; Römling et al, 2000; Römling et al, 1998; Weber et al, 2005). Das von DgcM synthetisierte c-di-GMP reprimiert zusätzlich die PdeR-vermittelte Interaktion, indem es in den DgcE-DgcQ-PdeH-Pool eingespeist wird und die enzymatische Aktivität von PdeR ebenso stimuliert.

DgcE (und DgcQ) und PdeH bilden demnach ein Regulationsmodul, welches durch zeitlich versetzte Expression beider Komponenten den c-di-GMP-Spiegel Wachstumsphasen-abhängig moduliert und sowohl über das c-di-GMP-bindende PilZ-Domänen-Protein YcgR die Flagellen-Rotation inhibiert, als auch über das Trigger-Enzym PdeR auf das zweite c-di-GMP-Modul wirkt (Boehm et al, 2010; Lindenberg et al, 2013; Pesavento et al, 2008; Ryjenkov et al, 2006; Zorraquino et al, 2013). Im Gegensatz zu DgcE-PdeH stellen DgcM und PdeR ein c-di-GMP-Modul dar, welches durch lokale Sequestrierung und über regulatorische Protein-Interaktionen mit MlrA hoch spezifisch auf die Expression von *csgD* wirkt und damit die Synthese von Curli Fimbrien und Cellulose kontrolliert (Lindenberg et al, 2013; Weber et al, 2006).



**Abb. 2. Regulation von Motilität und CsgD-abhängiger Matrixproduktion in *E. coli*.** Flagellensynthese und die Produktion von Curli Fimbrien und Cellulose werden in *E. coli* invers reguliert und auf verschiedenen Hierarchie-Ebenen kontrolliert. Auf oberster Ebene beider Kaskaden stehen Sigma-Faktoren, die um Bindung an der RNA-Polymerase konkurrieren, während verschiedenste Transkriptionsregulatoren und das Signalmolekül c-di-GMP auf niedrigeren Ebenen agieren. Von PdeH, DgcE und DgcQ (YhjH, YegE, YedQ) generiertes c-di-GMP reguliert YcgR und den PdeR-DgcM-MlrA-Komplex (YciR-YdaM-MlrA), der die *csgD*-Expression kontrolliert, während ein lokales c-di-GMP-Modul aus DgcC (YaiC) und einer noch nicht identifizierten PDE die Cellulose-Synthese stimuliert. Während in Flüssigkulturen beide Kaskaden temporär getrennt voneinander vorkommen (post-exponentielle bzw. stationäre Phase), sind in Makrokolonien räumlich getrennte Subpopulationen zu finden, deren Genexpression abhängig von der Lage im Biofilm der einen oder der anderen Kaskade unterliegt (Übernommen aus Serra & Hengge, 2014).

Ein weiteres Modul stellen DgcO (YddV bzw. DosC) und PdeO (YddU bzw. DosP) dar, denen eine Sauerstoff-abhängige Rolle bei der Regulation der RNA-Prozessierung durch Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) im RNA-Degradosom zugeordnet wird (Tuckerman et al, 2011).

Vier der 29 GGDEF-/EAL-Domänen-Proteine in *E. coli* tragen degenerierte Domänen und sind demnach nicht an der Umsetzung von c-di-GMP beteiligt. Das degenerierte EAL-Domänen-Protein RfIP (YdiV) interagiert über FlhD mit dem Transkriptionsregulator der Flagellensynthese, FlhDC. Dies verhindert die DNA-Bindung an FlhDC-regulierte Promotoren und führt den Komplex der ClpXP-Protease zu (Takaya et al, 2012; Wada et al, 2011). CsrD (YhdA), bestehend aus GGDEF- und EAL-Domäne (beide degeneriert), bindet die kleinen RNAs CsrB und CsrC und führt sie dem RNaseE-vermittelten Abbau zu (Suzuki et al, 2006). CsrB und CsrC wirken antagonistisch auf CsrA, welches durch seine Fähigkeit, RNAs zu binden, Einfluss auf die Stabilität zahlreicher mRNAs im zellulären Metabolismus hat. Durch CsrD-veranlassten Abbau von CsrB/C wird CsrA aktiviert und kann nun seinerseits regulatorisch wirksam werden und die Flagellensynthese über FlhDC stimulieren bzw. die PGA-Synthese reprimieren (Jonas et al, 2008). BluF (YcgF) setzt sich aus degenerierter EAL- und N-terminaler BLUF-Sensordomäne zusammen und wirkt in Abhängigkeit von Blaulicht als Anti-Repressor des Transkriptionsregulators BluR (YcgE), welcher über das *ycgZ-ymgAB*-Operon die Synthese von Kolansäure stimuliert und die Curli-Synthese unabhängig von c-di-GMP inhibiert (Tschowri et al, 2009; Tschowri et al, 2012). Einzig für das degenerierte GGDEF-Domänen-Protein CdgI (YeaI) konnte die Bindung von c-di-GMP gezeigt werden, während RfIP, CsrD und BluF unabhängig vom sekundären Signalmolekül agieren (Skopp & Hengge, unveröffentlichte Daten). Ob CdgI als Effektor in der c-di-GMP-Signalkaskade wirkt, ist bisher nicht bekannt. Die Einordnung der übrigen GGDEF-/EAL-Domänen-Proteine in die c-di-GMP-abhängige Regulation der Matrixproduktion und im Besonderen der Cellulose-Synthese in *E. coli* ist Gegenstand dieser Arbeit.

### 1.3. Bakterielle Cellulose als Matrixkomponente

Während Cellulose Pflanzen in der primären und sekundären Zellwand Stabilität verleiht, stellt sie im bakteriellen Biofilm einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix dar (Carpita, 2011; Römling, 2002; Serra et al, 2013a; Solano et al, 2002; Zogaj et al, 2001). So sind in der Klasse der *Gamma*proteobacteria 479 Spezies

---

vertreten, deren Genome Protein-Cluster kodieren, die mit Komponenten des Cellulose-Synthese-Komplexes in Zusammenhang stehen (NCBI protein cluster PCLA\_431566). Darüber hinaus wird Cellulose von Protisten (Grimson et al, 1996), Algen (Domozych et al, 2012), Tunicaten (Hirose et al, 2011) und Cyanobakterien produziert, wobei die Syntheseapparate letzterer als gemeinsamer Vorfahre aller Cellulose-spezifischen Glycosyltransferasen diskutiert werden (Nobles et al, 2001).

### 1.3.1. An der Cellulose-Synthese beteiligte Komponenten

Als Substrat der Cellulose-Synthese dient UDP-Glucose, welches über  $\beta$ -1-4-glycosidische Bindung und unter Abspaltung von UDP auf das wachsende Cellulose-Polymer übertragen wird (Gardner & Blackwell, 1974). Diese Verknüpfung wird in Bakterien durch **BcsA** katalysiert, einer in die innere Zellmembran (IM) eingebetteten Glycosyltransferase (GT) (Bureau & Brown, 1987; Morgan et al, 2012; Whitney & Howell, 2013). Inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte gewährleisten zusätzliche Stabilität des Polymers (Nishiyama et al, 2003; Notley et al, 2004). Sowohl Sequenzanalysen als auch die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur zeigen, dass die cytoplasmatische GT-Domäne N- und C-terminal von jeweils vier Transmembran-Domänen flankiert wird, während sich C-terminal eine cytoplasmatische PilZ-Domäne anschließt (Morgan et al, 2012)(Abb. 3A). BcsA stellt eine prozessive GT dar, die während der Synthese das wachsende Polymer ständig gebunden hat und nur das zweite Reaktionsprodukt, die UDP-Einheiten, ins Cytoplasma entlässt (Brown et al, 2012). Das Cellulose-Polymer selbst gleitet in einen Kanal, der von sechs Transmembran-Domänen gebildet wird und sich an das enzymatische Zentrum anschließt. Dieser durchspannt die inneren Zellmembran und mündet im Periplasma zwischen BcsA und BcsB (McNamara et al, 2015; Morgan et al, 2012; Omadjela et al, 2013).

Jede Glucose-Untereinheit liegt in Relation zu den sie flankierenden Einheiten um  $180^\circ$  gedreht vor, was charakteristisch für  $\beta$ -1,4-Glucane wie Cellulose, Chitin, Curdlan oder Hyaluron ist und ihre Wasserunlöslichkeit ermöglicht (Hubbard et al, 2012). Die erstmalige Kristallisation von BcsA gelang mit einer nur schwach gebundenen Glucose-

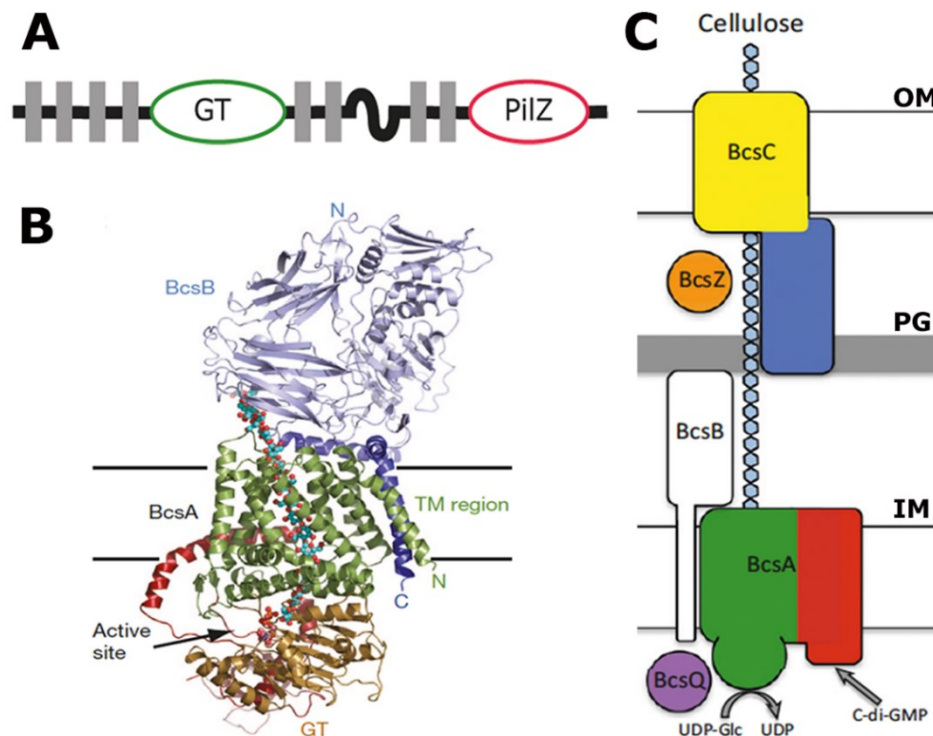
Einheit am terminalen Ende des Cellulose-Polymers (Morgan et al, 2012)(Abb. 3B). Dies unterstützt die These, dass alle Glycosyl-Einheiten in gleicher Ausrichtung mit dem wachsenden Cellulose-Polymer verknüpft werden und erst im Anschluss um die Achse der Acetyl-Bindung rotieren (McNamara et al, 2015).

Obwohl BcsA die eigentliche Glycosyltransferase darstellt, kommt es nur im Komplex mit der Co-Synthase **BcsB** zur Cellulose-Synthese *in vitro*. *bcsB* kodiert für ein Protein mit N-terminaler Signalsequenz, einer weit ins Periplasma reichenden Domäne und einem C-terminalen Transmembran-Anker in der IM (Morgan et al, 2012; Omadjela et al, 2013). Der periplasmatische Bereich setzt sich aus zwei Domänen zusammen, die Homologien zu Carbohydrat-bindenden Motiven aufweisen (Christiansen et al, 2009). Eine Interaktion zwischen BcsB und dem Cellulose-Polymer konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden (McNamara et al, 2015). Für die *in vitro* Funktion im Komplex mit BcsA ist nur der Transmembran-Anker zusammen mit einer vorhergehenden amphipatischen Helix essentiell und stabilisiert den Komplex möglicherweise in der Membran (Omadjela et al, 2013)(Abb. 3B).

Die periplasmatische Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase **BcsZ** kann durch teilweise Hydrolyse des Cellulose-Moleküls mögliche Spannungen im Polymer reduzieren bzw. fehlgeleitete Cellulose-Stränge abbauen (Delmer, 1999). BcsZ ermöglicht nicht die Nutzung von Cellulose als Nährstoffquelle. Für den extrazellulären Cellulose-Abbau in *E. coli* kodieren zwei kryptische Operone (*bglGFBH* & *chbBCARFG*), die in keinem Zusammenhang zum *bcs*-Lokus stehen (Park & Yun, 1999).

Während für die *in vitro* Synthese von Cellulose BcsA und BcsB ausreichend sind (Omadjela et al, 2013), ist für die Produktion *in vivo* neben BcsZ auch **BcsC** essentiell (Matthysse et al, 1995a; Matthysse et al, 1995b; Saxena et al, 1994). Sequenzanalysen und Homologien mit Komponenten des Alginate-Synthese-Komplexes (s. u.) legen nahe, dass BcsC ein Porin in der äußeren Membran (OM) bildet und damit den Transport aus der Zelle gewährleistet (Keiski et al, 2010; Rehman & Rehm, 2013; Whitney & Howell, 2013)(Abb. 3C). Der N-Terminus ragt weit ins Periplasma hinein und setzt sich aus Tetra-Trico-Peptid-Einheiten zusammen, die an der Interaktion mit anderen Proteinen oder dem Cellulose-Polymer beteiligt sein können (Whitney &

Howell, 2013; Zeytuni & Zarivach, 2012). Da auch BcsB weit ins Periplasma reicht, ist eine Interaktion zwischen beiden denkbar (McNamara et al, 2015).



**Abb. 3. Der Cellulose-Synthese-Komplex als Bestandteil der inneren Zellmembran.** A) Organisation der Domänenstruktur von BcsA auf Grundlage seiner Aminosäuresequenz (ausgehend von McNamara et al, 2015 & Omadjela et al, 2013). Mögliche Transmembran-Domänen (TMDs) sind als graue Rechtecke dargestellt. Die flexible Gating-Loop befindet sich zwischen TMD6 und TMD7 (~). B) Röntgenkristallstruktur von BcsA-BcsB in der inneren Zellmembran. Grün: TMDs von BcsA; beige: GT-Domäne; rot: Gating-Loop; blau: BcsB (Morgan et al, 2012). C) Schematischer Überblick über den Cellulose-Synthese-Apparat. Das in die innere Membran eingebettete BcsA synthetisiert aus UDP-Glucose-Einheiten das wachsende Cellulose-Polymer und transportiert es gleichzeitig durch die Membran. Der Export durch die äußere Membran wird durch BcsC gewährleistet. Grün: GT-Domäne; rot: c-di-GMP-bindende PilZ-Domäne; blau: Tetra-Trico-Peptid-Domäne; gelb: OM-Porin; orange: Endoglucanase; violett: MinD-Homolog; weiß: Co-Polymerase mit unbekannter Funktion. UDP-Glc: UDP-Glucose; OM: äußere Membran; PG: Peptidoglycan; IM: innere Membran (Entnommen & modifiziert aus Whitney & Howell, 2012).

Alle bisher genannten Komponenten werden im *yhjR-bcsQABZC*-Operon kodiert. Dieses zeigt in *E. coli* eine schwache Basalexpression, die mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase oder unter verschiedenen Stressbedingungen ansteigt (Serra et al, 2013a; Weber et al, 2005; Zogaj et al, 2001). Römeling und Galperin unterscheiden vier verschiedene Klassen von *bcs*-Operonen in Bakterien, wobei jedoch stets Homologe zu

BcsA, BcsB, BcsZ und BcsC zu finden sind und diese damit den minimalen Komplex zur Cellulose-Synthese darstellen (Römling & Galperin, 2015). In zahlreichen Beta- und Gamma-Proteobakterien wie *E. coli* sind zwei weitere Gene Bestandteil des *bcs*-Operons: *yhjR* und *bcsQ* (Römling et al, 2007; Römling & Galperin, 2015), wobei die Funktion von **YhjR** unbekannt ist und **BcsQ**, ein MinD-Homolog darstellt, das möglicherweise an der polaren Lokalisation des Synthese-Apparates beteiligt ist (Le Quere & Ghigo, 2009).

Das zweite in *Enterobacteriaceae* konservierte *bcs*-Operon, *bcsEFG*, ist zur maximalen Synthese von Cellulose nötig, wobei über die Funktion seiner Genprodukte wenig bekannt ist (Serra et al, 2013a; Solano et al, 2002; Zogaj et al, 2001). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigt, dass BcsE c-di-GMP an einem Motiv bindet, dass der I-Site von DGCs ähnelt (Fang et al, 2014). Obwohl BcsE und DGCs in diesem Bereich auf Aminosäure-Ebene keine Ähnlichkeiten zeigen, sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen der Proteine im c-di-GMP-bindenden Bereich vergleichbar. Die c-di-GMP-Bindung durch BcsE ist essentiell für dessen stimulierende Funktion auf die Cellulose-Synthese (Fang et al, 2014).

### 1.3.2. Formen der chemischen Modifikation und supramolekulare Struktur

*P. fluorescens* SBW25 und *P. syringae* synthetisieren eine acetylierte Form der Cellulose, die erhöhte Mengen Wasser binden kann und vorwiegend an der Ausbildung von Pellicle-Biofilmen auf Flüssigkeits-Oberflächen beteiligt ist. Die Modifizierung des Cellulose-Polymers wird durch periplasmatische Acetylasen katalysiert, die zusammen mit dem übrigen Synthese-Komplex in einem Operon transkribiert werden (hier: *wssA-J*-Operon)(Spiers, 2007; Spiers et al, 2003; Whitney & Howell, 2013). Die Cellulose-Synthese in *Agrobacterium tumefaciens* basiert auf UDP-Glucose-Lipid-Intermediaten, was zusätzliche Synthese-Komponenten voraussetzt, die in einem zweiten Cellulose-Operon kodiert werden (Matthysse et al, 1995a; Matthysse et al, 1995b).

Pflanzen und *Gluconacetobacter* bilden Cellulose in Form parakristalliner Microfibrillen, während die meisten Bakterien amorphe, gewebeartige Cellulose-

---

Aggregate synthetisieren (Saxena & Brown, 2005; Serra et al, 2013a). Die Ausbildung dieser supramolekularen Strukturen findet außerhalb der Zelle nahe der Zelloberfläche statt und wird durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert (Benziman et al, 1980; Brown et al, 1976; Haigler et al, 1980; Saxena & Brown, 2005; Serra et al, 2013a). Diese Strukturen werden unter anderem durch die Lage der Cellulose-Synthese-Komplexe mitbestimmt. In Pflanzen sind jeweils sechs dieser Komplexe als Rosette angeordnet, während sie sich in *G. xylinus* entlang der Zellachse aneinanderreihen (Brown et al, 1976; Carpita, 2011). Beides begünstigt die Ausbildung von Mikrofibrillen. *D. discoideum* zeigt eine Zellzyklus-abhängige Umstrukturierung der Synthese-Komplexe und damit die Ausbildung unterschiedlicher Cellulose-Strukturen (Grimson et al, 1996). In stäbchenförmigen Bakterien wie *E. coli* und *Salmonella spec.* hingegen wurde die Ausbildung amorpher Cellulose-Aggregate am Zellpol beobachtet, was auf die Lage der Synthese-Komplexe an diesen hindeutet (Le Quere & Ghigo, 2009).

### 1.3.3. Regulation durch c-di-GMP

Während pflanzliche, bakterielle und selbst tierische Cellulose-Synthasen weitgehende Sequenzhomologien aufweisen, ist die Regulation der Synthese recht verschieden. Im Rahmen der bakteriellen Cellulose-Synthese erfolgt dies über die c-di-GMP-bindende PilZ-Domäne von BcsA (Amikam & Galperin, 2006; Ross et al, 1987). BcsA liegt in Abwesenheit von c-di-GMP in einem autoinhibitorischen Zustand vor, da der Eingang zum katalytischen Zentrum der GT-Domäne durch eine flexible Gating-Loop versperrt ist (Morgan et al, 2014; Morgan et al, 2012)(Abb. 3). Durch Bindung zweier interkalierender c-di-GMP-Moleküle an die C-terminale PilZ-Domäne kommt es zu Konformationsänderungen im Protein, die auch die Gating-Loop betreffen. Diese gibt den Eingang zum katalytischen Zentrum für eine neue UDP-Glucose-Einheit frei und aktiviert so die Cellulose-Synthese. Die Mutation des RxxxR-Motivs zu AxxxR kann die Interaktion zwischen PilZ-Domäne und Gating-Loop unterbinden. Folge dessen ist eine konstitutiv aktive GT (Morgan et al, 2014).



---

Weiteren regulatorischen Einfluss haben verschiedenste DGCs, die den Cellulose-spezifischen c-di-GMP-Pool speisen und je nach Spezies, Stamm oder auslösenden Umweltreiz variieren können (Da Re & Ghigo, 2006). Für die DGC AdrA in *Salmonella spec.* und das entsprechende Homolog in *E. coli*, DgcC, kann bereits ein spezifischer Einfluss auf die Cellulose-Synthese bestätigt werden (Garcia et al, 2004; Römling et al, 2000). Die Expression unterliegt in beiden Spezies der Kontrolle des Transkriptionsregulators CsgD, der auch die Synthese amyloider Curli Fimbrien stimuliert (Römling et al, 2000; Weber et al, 2006)(vgl. auch Kapitel 1.2.4). Da Re und Ghigo zeigen in *E. coli* 1094 und DSM6601 einen CsgD-unabhängigen Weg der Cellulose-Synthese über DgcQ auf und weisen darauf hin, dass in *E. coli* 1125 noch eine weitere DGC an der Cellulose-Synthese beteiligt ist (Da Re & Ghigo, 2006). In *K. pneumoniae* wurde DgcN (YfiN) als Cellulose-spezifische DGC diskutiert (Huertas et al, 2014). Gleiches gilt in *E. coli* in Abhängigkeit des DSB-Systems, welches die Bildung inter- und intramolekularer Disulfidbrücken periplasmatischer Proteine katalysiert. So wird durch Deletion von DSB-Komponenten bzw. unter reduzierenden Umweltbedingungen das DgcN-inhibierende Protein YfiR destabilisiert und die Cellulose-Synthese aktiviert (Hufnagel et al, 2014). Zusätzlich wurden weitere DGCs identifiziert, die die Cellulose-Synthese in Abhängigkeit spezifischer Umweltsignale stimulieren (Amarasinghe et al, 2013; Mills et al, 2015). Trotz zahlreicher Belege zu BcsA-aktivierenden Enzymen ist bisher jedoch kein Wirkmechanismus bekannt, der die Spezifität einzelner DGCs auf die Cellulose-Produktion erklärt. Darüber hinaus wurden bisher nur wenige PDEs identifiziert, die als regulatorisches Pendant zu DGCs die Synthese negativ kontrollieren (Anwar et al, 2014; Brombacher et al, 2006). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geben weiteren Einblick in die c-di-GMP-regulierte Cellulose-Synthese in *E. coli*.

Die pflanzliche Cellulose-Synthese wird nicht durch c-di-GMP aktiviert, wobei jedoch andere regulierende Faktoren oder mit der GT interagierende Proteine denkbar sind (Pagant et al, 2002; Roudier et al, 2005; Vain et al, 2014). Zusätzlich zur hoch konservierten GT-Domäne verfügen pflanzliche Cellulose-Synthasen über zwei weitere Motive, die solch regulatorische Funktionen übernehmen können (Saxena & Brown, 2005; Sethaphong et al, 2013).

---

#### 1.3.4. Bedeutung bei der Biofilmbildung

In zahlreichen *Proteobacteria* wie *E. coli* und *Salmonella* bildet Cellulose neben amyloiden Proteinen einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix im Biofilm (Fazli et al, 2014; Serra et al, 2013a; Solano et al, 2002; Zogaj et al, 2001). Während Cellulose-Polymere elastische Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Interaktionen über Distanzen von mehreren  $\mu\text{m}$  gewährleisten, fördern amyloide Curli Fimbrien die Interaktion benachbarter Zellen und sind an der Ausbildung Bienenwaben-artiger Strukturen beteiligt, die sich schützend um die Zellen legen (Serra et al, 2013a). Zusätzlich kommt es zur Interaktion von Curli Fimbrien mit Cellulose, wie sie auch für andere Protein-Polysaccharid-Kombinationen beobachtet wurden (de Jong et al, 2009; Lasa, 2006; Ostrowski et al, 2011; Serra et al, 2013a). Folge dessen ist die Ausbildung einer gewebeartigen Matrix, die nicht angreifbar für Proteasen oder Cellulasen ist und dem Biofilm ein hohes Maß an Stabilität bei gleichzeitiger Elastizität verleiht (Serra et al, 2013a; Zogaj et al, 2001).

Cellulose bindet besonders in seiner acetylierten Form große Mengen Wasser und bietet so Schutz vor biotischen und abiotischen Stress, wie der Austrocknung von Biofilm und Nährstoffsubstrat, und nimmt damit eine vergleichbare Rolle wie das hydrophobe BslA ein, welches sich wie eine äußere Hülle schützend um *Bacillus*-Kolonien legt (Hobley et al, 2013; Serra et al, 2015; Williams & Cannon, 1989). Zusätzlich ermöglicht die Synthese von Cellulose eine effizientere Ausbreitung auf festen oder flüssigen Oberflächen (Serra et al, 2013a; Spiers et al, 2003). Dies kann Konkurrenten in ihrem Wachstum einschränken, indem ihnen der Zugang zum nährstoffreichen Substrat erschwert wird oder der sich schnell ausbreitende Biofilm sie von der Sauerstoff-Zufuhr trennt (Spiers, 2014; Williams & Cannon, 1989). Eine Biofilm-Matrix basierend auf Polysacchariden und amyloiden Proteinen gewährleistet zudem Schutz vor Penetration durch Fraßfeinde. So zeigen DePas et al., dass besonders Cellulose eine mechanische Barriere zum Schutz vor *Caenorhabditis elegans* bietet, während Curli Fimbrien *E. coli* vor der Zellyse durch *Myxococcus xanthus* schützen (DePas et al, 2014). Neben der Beteiligung am Aufbau der Biofilmmatrix dient das Polysaccharid auch der Adhärenz an Bodenbestandteile und Pflanzen (Barak et al, 2007; Brandl et al, 2011; de

Jong et al, 2009; Kroupitski et al, 2013; Matthysse et al, 2008; Matthysse et al, 2005; Smit et al, 1992), während ihm bei der Interaktion mit eukaryotischen Zellen eher eine untergeordnete oder gar inhibierende Rolle zukommt (Norinder et al, 2011; Wang et al, 2006).

### 1.3.5. Andere c-di-GMP-regulierte Exopolysaccharide

Analog zu Cellulose wird auch **Alginat** in *Pseudomonas* und *Azotobacter* durch eine membranständige, c-di-GMP-abhängige GT-2 synthetisiert. Synthese-Funktion und c-di-GMP-Bindung werden hier jedoch von unterschiedlichen Komponenten vermittelt, Alg8 und Alg44 (Merighi et al, 2007; Remminghorst & Rehm, 2006a; Remminghorst & Rehm, 2006b). Synthese und Abbau von c-di-GMP für die Aktivierung von Alg8-Alg44 werden durch das GGDEF-EAL-Domänen-Protein MucR gewährleistet, welches sowohl DGC- als auch EAL-Aktivität besitzt und diese in Abhängigkeit von Nitrat koordiniert (Hay et al, 2009; Wang et al, 2015).

Auch die Synthese von **Poly- $\beta$ -1,6-N-Acetyl-D-glucosamin (PGA)** ist abhängig von c-di-GMP und dient beispielsweise in *E. coli* und *Yersinia pestis* zur Ausbildung von Biofilmen im Wirt bei Temperaturen über 30°C (Al Safadi et al, 2012; Wang et al, 2004). Die Expression des *pga*-Operons wird in Abhängigkeit von c-di-GMP stimuliert (Jonas et al, 2008). Ob diese Regulation durch Transkriptions-Initiation, Änderung der mRNA-Stabilität oder auf anderer Ebene stattfindet, konnte bisher nicht geklärt werden. Darüber hinaus stabilisiert die Bindung von c-di-GMP den Protein-Komplex PgaC-PgaD, die Analog zu BcsA-BcsB und Alg8-Alg44 den PGA-Synthese-Komplex in der inneren Zellwand bilden (Boehm et al, 2009; Steiner et al, 2013). Die PGA- Synthese wird von DgcO, DgcT (YcdT) und DgcH (YdeH) stimuliert (Boehm et al, 2009; Jonas et al, 2008).

Zusätzlich zu Alginat tragen in einigen *P. aeruginosa*-Stämmen die Exopolysaccharide **Pel und Psl** zur Bildung von Pelicle-Biofilmen bei (Ghafoor et al, 2011). Im Fall beider Polysaccharide stimulieren hohe zelluläre c-di-GMP-Spiegel die Expression der zur Synthese nötigen Gene (Baraquet et al, 2012; Hickman & Harwood, 2008). Während die GTs zur Synthese von Cellulose, Alginat und PGA in der inneren Zellmembran

---

eingebettet sind (Whitney & Howell, 2013), ist die Pel-synthetisierende GT PelF ein cytoplasmatisches Enzym (Ghafoor et al, 2013). Die Aktivität von PelF und der Pel-Export ins Periplasma werden durch Protein-Interaktionen mit PelD reguliert, welches als Membran-Protein über ein stark degeneriertes GGDEF-Motiv verfügt, c-di-GMP jedoch an seiner konservierten I-Site bindet (Lee et al, 2007; Whitney et al, 2012).

#### 1.4. *Escherichia coli* als Humanpathogen

Als Bewohner der Darmflora siedelt sich *E. coli* im Mucus an und gilt hier als wichtiger Bestandteil der Mikrobionta. Diese ökologische Nische hat sich das Bakterium vermutlich durch die effizientere Umsetzung von Gluconat durch den Entner-Doudoroff-Weg erschlossen (Sweeney et al, 1996). Neben kommensalen *E. coli*-Stämmen, die nur für immunsupprimierte Patienten pathogen werden können, haben sich zahlreiche Linien entwickelt, die durch Toxin-Synthese oder Aggregation an Epithelzellen als ernstzunehmende Krankheitserreger wahrzunehmen sind. Eine Klassifizierung dieser in verschiedene Subspezies wird durch die Angabe von Serotypen gewährleistet, die Variationen charakteristischer Antigen-Merkmale von Lipopolysacchariden (O), Flagellin-Untereinheiten (H) oder Kapsel-Polysacchariden (K) beschreiben (Nataro & Kaper, 1998).

Je nach Wirkungsort lassen sich drei Hauptformen humanpathogener *E. coli* unterscheiden: i.) Uropathogene *E. coli* (UPEC), die Harnwegs-Infekte verursachen oder ii.) Meningitis-auslösende *E. coli* (NMEC), die sich durch Überwindung der Blut-Hirn-Schranke auszeichnen. Der Fokus eines Teils dieser Arbeit liegt jedoch auf iii.) enterischen *E. coli* (EPEC), die mit Erkrankungen des Intestinal-Traktes assoziiert sind und sich je nach Interaktion mit dessen Epithelzellen und der Synthese unterschiedlicher Virulenzfaktoren in verschiedene Kategorien unterteilen lassen, von denen im Folgenden zwei näher beschrieben werden.

Enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC) zeichnen sich durch die Synthese von Shiga-Toxin (auch Verocytotoxin) aus, dessen Target rRNA und damit die Inhibierung der Proteinbiosynthese darstellt (Johannes & Romer, 2010). Es werden zwei Subspezies unterschieden, Stx1 und Stx2, die auf Lambda-ähnlichen Prophagen kodiert sind, die

im bakteriellen Genom zumeist im ORF *mlrA* (*stx1*) bzw. *wrbA* (*stx2*), welcher für eine NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase kodiert, integriert sind (Shaikh & Tarr, 2003; Yokoyama et al, 2000). Zusätzlich induzieren EHECs Umstrukturierungen des Cytoskeletts innerhalb der Endothelzellen. Diese können zur Ausbildung Sockel-ähnlicher Strukturen führen, an die sich die Pathogene anheften. Ausgelöst werden diese Umstrukturierungen durch Intimin, welches Bestandteil der äußeren Zellmembran ist und durch einen ORF im LEE-Pathogenitäts-Lokus (Locus of Enterocyte Effacement) kodiert wird (Higgins et al, 1999). Zusätzlich zu Intimin kodiert dieser Bereich für ein Typ-III Sekretions-System und einen Intimin-spezifischen Rezeptor (Tir). Dieser kann mittels des Typ-III Sekretions-Systems in die Membran der Wirtszellen eingebracht werden und dem Bakterium dort als Rezeptor dienen (Kenny et al, 1997). Folge von EHEC-Infektionen sind Schädigungen des Darmepithels und dadurch entstehende Blut-Diarrhoe. Sofern freigesetzte Shiga-Toxine über die Blutbahn in die Nieren gelangen, kann es zur Ausbildung des Hämolytisch-urämischen Syndroms, kurz HUS, kommen, welches mit Nierenkomplikationen und Anämie einhergeht und zum Tod führen kann (Andreoli et al, 2002; Kaper et al, 2004).

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) zeichnen sich durch eine charakteristische Anheftung an Darmepithelzellen aus: die kompakte Form der Aggregation erinnert an versetzt angeordnete Ziegelsteine (Nataro & Kaper, 1998) und wird unter anderem durch Plasmid-kodierte autoaggregative Fimbrien (AAF) gewährleistet (Harrington et al, 2006). EAEC-Biofilme im Colon bilden ein stetiges Pathogen-Reservoir, das im Vergleich zu EHEC-Infektionen chronisch anhaltende statt akute Durchfälle zur Folge hat (Mossoro et al, 2002; Nataro et al, 1998). EAEC synthetisieren keine Shiga-Toxine. Die Ausschüttung anderer Toxine führt jedoch ebenso zur Entzündung und Schädigung des Darmgewebes (Nataro et al, 1998).

Im Sommer 2011 kam es in Mitteleuropa zu einem EHEC-Ausbruch, infolgedessen 3842 Personen erkrankten. Der Schwerpunkt der Erkrankungen lag vor allem in Norddeutschland und erreichte im Mai und Juni 2011 seinen Höhepunkt. 2987 der betroffenen Patienten entwickelten eine Gastroenteritis, 855 erkrankten an HUS und 53 Personen erlagen dem Erreger (Bielaszewska et al, 2011; Mellmann et al, 2011; Muniesa et al, 2012). Genom-Sequenzierungen, Analysen der Virulenzprofile und Vergleiche mit

---

anderen pathogenen *E. coli* legen nahe, dass der Erreger in die Gruppe enteroaggregativer *E. coli* (EAEC) einzuordnen ist, sich jedoch zusätzlich durch die Synthese von Shiga-Toxin 2 auszeichnet, einem Charakteristika klassischer EHEC-Stämme (Bielaszewska et al, 2011; Mellmann et al, 2011). Der Ausbruchstamm trägt den Serotyp O104:H4, welcher in der Vergangenheit jedoch selten mit solch hohem Vorkommen von HUS assoziiert wurde (Rasko et al, 2011). Als wahrscheinlichster Infektionsherd gelten Sprossen eines norddeutschen Lieferanten, wobei *E. coli* O104:H4-Kontaminationen auf Sprossen oder im Betrieb selbst nicht direkt nachgewiesen werden konnten, mehrere dort Beschäftigte jedoch erkrankten (Buchholz et al, 2011; Muniesa et al, 2012). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten Aufschluss über mögliche Gründe für die hohe Virulenz des *E. coli* O104:H4-Ausbruchstammes geben.

---

## 2. Zielsetzung

Die Synthese einer extrazellulären Matrix aus Proteinen und Exopolysacchariden und die damit einhergehende Biofilmbildung werden in *Eubakterien* maßgeblich vom Signalmolekül c-di-GMP reguliert. c-di-GMP wird von DGCs und PDEs synthetisiert bzw. abgebaut, wobei bakterielle Genome meist für eine Vielzahl dieser Enzyme kodieren (Hengge, 2009). Die spezifischen und zum Umsatz notwendigen Domänen werden entsprechend ihrer konservierten Aminosäurereste GGDEF-/EAL- und HD-GYP-Domänen genannt (Galperin et al, 2001). *E. coli* K-12 verfügt über 29 GGDEF-/EAL-Domänen-Proteine, die unter anderem die Synthese amyloider Curli Fimbrien und extrazellulärer Cellulose regulieren. Im letzteren Fall wirkt c-di-GMP als allosterischer Aktivator, der die Cellulose-Synthase BcsA durch Bindung aktiviert (Morgan et al, 2014).

*E. coli* K-12 stellte hinsichtlich seiner c-di-GMP-Regulation und Biofilmbildung einen gut untersuchten Modellorganismus dar, der jedoch keine Cellulose produzierte (Da Re & Ghigo, 2006; Zogaj et al, 2001). Dieser Umstand mochte ein Grund dafür sein, dass die c-di-GMP-Regulation der Cellulose-Synthese in *E. coli* noch weitgehend ungeklärt war. In Anlehnung an Cellulose-produzierende pathogene *E. coli*-Stämme sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Cellulose-positiver K-12-Stamm etabliert werden, der Untersuchungen im Bereich der Sicherheitsstufe 1 möglich macht.

Vorhergehende Arbeiten in zahlreichen c-di-GMP-produzierenden Organismen legten nahe, dass nicht alle DGCs und PDEs gleichermaßen an der Kontrolle eines globalen c-di-GMP-Pools beteiligt sind. Vielmehr war zu vermuten, dass einzelne Regulationsmodule aus DGC, PDE, Effektor- und Zielmolekül spezifische Phänotypen regulieren (Hengge, 2009; Povolotsky & Hengge, 2012). Während in *E. coli* vergleichbare Module bereits für Curli-Synthese und Degradosom-Aktivität bekannt waren (vgl. Kapitel 1.2.4), sollte diese Arbeit zur Charakterisierung eines solchen Moduls im Rahmen der Cellulose-Synthese beitragen.

Obwohl als aktivierende DGC in *E. coli* und *Salmonella* die membranständige DgcC (YaiC/AdrA) galt (Römling et al, 2000), war die Rolle des c-di-GMP-abbauenden

---

Gegenspielers in diesem Modul noch unbesetzt. Mutantanalysen im Cellulose-positiven *E. coli* K-12 sollten zunächst dazu dienen, die Rolle von DgcC gegebenenfalls zu verifizieren und weitere Komponenten eines möglicherweise Cellulose-spezifischen c-di-GMP-Regulationsmoduls zu identifizieren. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte der regulatorische Mechanismus dieses Modul aufgeklärt werden. Folgende Fragen waren diesbezüglich zu klären: Sind DGC und PDE enzymatisch aktiv? Sofern dies zutrifft, sind diese Aktivitäten essentiell für die Cellulose-Synthese? Interagieren die Komponenten mit dem Cellulose-Synthese-Komplex und welche Rolle hätte diese Protein-Interaktion?

Parallel zu Beginn dieser Arbeit kam es im mitteleuropäischen Raum zu einem schweren Ausbruch enterohämorrhagischer *E. coli* O104:H4, in dessen Rahmen fast 4000 Menschen erkrankten, etwa 20% HUS entwickelten und 53 Patienten starben (Bielaszewska et al, 2011). Bis zu diesem Zeitpunkt zeigten Stämme des Serotyps O104:H4 nie zuvor eine solche Aggressivität bezüglich der Entwicklung von HUS (Rasko et al, 2011). Bioinformatische Analysen deuteten darauf hin, dass der O104:H4-Ausbruchsstamm über ein erhöhtes Potential zur Akkumulation von c-di-GMP verfügt (T. L. Povolotsky, 2014, PhD Thesis). Die durch c-di-GMP regulierten Curli-Fimbrien wirken proinflammatorisch im Wirt, während diese Wirkung bei gleichzeitiger Synthese von Cellulose abgeschwächt wird (Bian et al, 2000; Tükel et al, 2010; Wang et al, 2006). In Zusammenarbeit mit Tatyana L. Povolotsky sollte der O104:H4-Ausbruchsstamm hinsichtlich seiner Curli- und Cellulose-Synthese bei 37°C untersucht und mit anderen pathogenen *E. coli* verglichen werden. Auf diesem Weg sollte versucht werden, mögliche Gründe für die hohe Virulenz mit Hilfe eines charakteristischen Curli-Cellulose-Profiles erklären zu können und dabei zu helfen, diesen Ausbruch zu verstehen und künftige Epidemien besser kontrollieren zu können.



### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Geräte

<b>Äkta</b>	Äkta Purifier GE Healthcare
<b>Autoklav</b>	Technoclav 50. Tecnomara
<b>Blotting-Apparatur</b>	EBU-302. C.B.S. SCIENTIFIC
<b>Brutschrank</b>	Memmert
<b>Elektrophorese-Kammern</b>	Mini / Medi Protean II. BIO-RAD MGV 202-33. C.B.S. SCIENTIFIC Easy Cast B2. Owl Separation Systems
<b>Elektroporator</b>	GenePulser Xcell. BIO-RAD
<b>Elisa-Reader</b>	µQuant. Bio Tek Instruments Inc. Microplate-Reader Model 550. BIO-RAD
<b>Heizblöcke</b>	Thermomixer Comfort. eppendorf
<b>Kameras</b>	Leica DC 300F/ ICc3. Zeiss/ Canon 1100D
<b>Nano-Drop</b>	NanoDrop 2000. Peqlab
<b>Phosphorimager</b>	Typhoon Fla 7000. GE Healthcare
<b>Photometer</b>	GeneQuant 100. GE Healthcare
<b>Spannungsgeber</b>	EPS 600. Pharmacia Biotech
<b>Stereomikroskop</b>	Leica S8 AP0/ Stemi 2000-C. Zeiss
<b>Thermocycler/PCR-Geräte</b>	Arktik. Thermo Scientific
<b>Vertikalshaker</b>	Celloshaker. Renner GmbH
<b>Wasserbad</b>	HT Infors AG
<b>Zentrifugen</b>	Centrifuge 5417R. eppendorf/ Centrifuge 5804R. Eppendorf/ minispin plus. Eppendorf/ Thermo Scientific Sorval WX Ultra

### 3.2. Chemikalien

Während dieser Arbeit benutzte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Bioscience Europe GmbH (früher Pharmacia Biotech; Freiburg, D), Avanti Polar Lipids (Alabaster, US), Biorad (München, D), Biozym (Hess.-Oldendorf, D), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, D), Difco Laboratories (Augsburg, D), Eppendorf (Hamburg, D), Fluka (Neu-Ulm, D), GATC (Konstanz/ Köln, D), GE Healthcare (Freiburg, D), Hartmann Analytik GmbH (Braunschweig, D), IBA lifesciences (Göttingen, D), Merck & Merck Millipore (Darmstadt, D), Metabion (Steinkirchen, D), New England Biolabs (Frankfurt, D), Promega (Mannheim, D), Roboklon (Berlin, D), Roche Germany (Berlin, D), Qiagen (Hilden, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D).

### 3.3. Rezepte für Flüssigmedien und Agarplatten

#### 3.3.1. Flüssigmedien

<b>Luria-Bertani-Medium (LB)</b>	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren. LB Medium ohne Salz (**LBnoS**) wurde ohne Zugabe von NaCl hergestellt.

<b>SOB-Medium</b>	Bacto-Trypton	20 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	KCl	0,19 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren.

---

**SOC-Medium**

SOB-Medium unter Zusatz von	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM

Die Glukoselösung wurde filtriert, die Salzlösung autoklaviert.

**TB-Medium**

Bacto-Trypton	12 g
Bacto-Hefeextrakt	24 g
H <sub>2</sub> O	900 ml

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 100 ml Kalium-Phosphat-Puffer (Stammkonzentration: 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> & 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; separat sterilisiert durch Autoklavieren) und 5 ml Glycerin (Stammkonzentration 80 %; separat sterilisiert durch Filtration).

**2x TSS-Medium**

LB Medium unter Zusatz von	PEG-6000	20%
	MgSO <sub>4</sub>	100 mM
	DMSO	10%

**M9-Minimalmedium**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12H <sub>2</sub> O)	170 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22 mM
NaCl	8.5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	20 mM

M9 wurde als 10fach konzentrierte Stammlösung angesetzt, mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Im Anschluss wurden folgende Zutaten als sterile Lösungen zugegeben:

CaCl <sub>2</sub>	0.1 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
C-Quelle	0.2%

### 3.3.2. Festmedien

<b>LB/ LBnoS-Agar</b>	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Span- Agar	18 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren. LBnoS-Agar ohne Zugabe von NaCl.

<b>Yesca-Agar</b>	Casamino Acids	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	1 g
	Span- Agar	18 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren.

#### **M9-Agar**

18 g Difco-Agar wurden mit 900 ml H<sub>2</sub>O autoklaviert. Im Anschluss wurden folgende sterile Lösungen zugegeben:

10x M9-Stammlsg.	100 ml
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
C-Quelle	0.2%

#### **X-Gal-Agarplatten**

Autoklavierter LB-Agar unter Zugabe von 40 mg/l 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal, gelöst in N,N-Dimethylformamid und sterilfiltriert).

#### **Calcofluor-Platten (CF)**

LB/LBnoS-Agar unter Zugabe von 0,01% Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, Sigma; in H<sub>2</sub>O gelöst und ohne Sterilfiltration zum Medium).

### Congo-Rot-Platten (CR)

LB/LBnoS-Agar unter Zugabe von 20 ml Congo-Rot-Lösung pro 1 l.

Congo-Rot-Lösung in 70% Ethanol:

Congo-Rot 2 mg/ml

Coomassie-Brilliant-Blue G 1 mg/ml

Die Farbstofflösung wurde dem autoklavierten Agar steriltriftriert zugegeben.

### MacConkey-Platten

Herstellung unter Nutzung von MacConkey-Agar (Roth) nach Angaben des Herstellers. Sterilisation durch Autoklavieren. Zur Verwendung im Interaktionsassay wurden entsprechende Antibiotika (Amp<sup>100</sup>/Kan<sup>50</sup>) und Maltose (1%) zugegeben.

TOP-Agar	Bacto-Agar	7 g
	LB-Medium	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren.

## 3.4. Verwendete Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

Zeitgleich mit Verfassen dieser Dissertationsschrift kam es zu einer Umbenennung aller von *E. coli* kodierten GGDEF-/EAL-Domänen-Proteine (Hengge et al, 2015). Im Verlauf dieser Arbeit wurden bei erster Erwähnung alte und neue Bezeichnung parallel genutzt. In dieser Stammliste ist jedoch die ursprüngliche Nomenklatur verwendet worden, um einen erleichterten Umgang mit der Stammliste der Laborsammlung AG Hengge zu gewährleisten. Die neuen Gen-Bezeichnungen lauten wie folgt: *yaiC-dgcC*, *yegE-dgcE*, *yneF-dgcF*, *yliF-dgcI*, *yeaJ-dgcJ*, *ydaM-dgcM*, *yfiN-dgcN*, *yddV-dgcO*, *yeaP-dgcP*, *yedQ-dgcQ*, *yedT-dgcT*, *ydeH-dgcZ*, *yfeA-pdeA*, *ylaB-pdeB*, *yjcC-pdeC*, *yoaD-pdeD*, *yfgF-pdeF*, *ycgG-pdeG*, *yhjH-pdeH*, *yliE-pdeI*, *yhjK-pdeK*, *yahA-pdeL*, *rtn-pdeN*, *yddU-pdeO*, *yciR-pdeR*, *ycgF-bluf*, *yeaI-cdgl*, *yhdA-csrD*, *ydiV-rlfP* (vgl. Tab. A1).

**Tab. 1.** Liste der genutzten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/ Beschreibung	Referenz
W3110	<i>E. coli</i> K12 <i>thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I</i>	(Hayashi et al, 2006)
AR3110	<i>bcsQ</i> * Cellulose-positives Derivat von W3110	Diese Arbeit (Serra et al, 2013a)
EDL933	<i>E. coli</i> O157:H7	(Riley et al, 1983)
HUSEC041	<i>E. coli</i> O104:H4; isoliert 2001	(Mellmann et al, 2008)
EAEC 55989	<i>E. coli</i> O104:H4	(Mossoro et al, 2002)
LB226692	Sequenzierter Ausbruchsstamm	(Mellmann et al, 2011)
RKI II-2027	Vom RKI als offizieller Ausbruchsstamm deklariert.	
BL21(DE3)	<i>E. coli fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
ER2566	<i>E. coli fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 (mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs
C41 (DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Derivat <i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub>)(DE3)</i>	(Miroux & Walker, 1996)
Rosetta(DE3)	<i>E. coli F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cm<sup>R</sup>)</i>	Novagen
FI1202	W3110 <i>ΔlacI<sup>q</sup> lacL8 glnG::Tn5</i> 202	(Fiedler & Weiss, 1995)
AP207	W3110 <i>yddV::scar</i>	Laborsammlung
AP271	W3110 <i>Δlac(I-A) λRS45 (csgB::lacZ) hybr. yegE::scar</i>	Laborsammlung
AP317	AR3110 <i>bcsC::kan</i>	Laborsammlung
AP321	AR3110 <i>bcsG::kan</i>	(Richter et al, 2014)
AP322	AR3110 <i>bcsZ::scar</i>	Laborsammlung
AP323	AR3110 <i>bcsE::scar</i>	(Richter et al, 2014)
AP324	AR3110 <i>bcsF::scar</i>	(Richter et al, 2014)
GB899	W3110 <i>yahA::scar</i>	Laborsammlung
NS339	W3110 <i>csgD::scar</i>	Laborsammlung
NS349	W3110 <i>ydaM::scar</i>	Laborsammlung
NS350	W3110 <i>yjhH::scar</i>	Laborsammlung
NS351	W3110 <i>yegE::scar</i>	Laborsammlung
OS65	W3110 <i>ycdT::scar</i>	Laborsammlung
OS66	W3110 <i>yedQ::scar</i>	Laborsammlung
OS67	W3110 <i>yfiN::scar</i>	Laborsammlung
OS68	W3110 <i>yeaI::scar</i>	Laborsammlung
OS69	W3110 <i>yhdA::scar</i>	Laborsammlung
OS70	W3110 <i>ydiV::scar</i>	Laborsammlung
SL164	W3110 <i>Δlac(I-A) λRS45 (csgB::lacZ) hybr. yjhH::cm</i>	Laborsammlung
AR32	W3110 <i>rpoS::scar</i>	MA Thesis Richter
AR38	W3110 <i>yciR::scar</i>	MA Thesis Richter
AR54	W3110 <i>ydeH::scar</i>	Diese Arbeit
AR56	W3110 <i>yeaJ::scar</i>	Diese Arbeit

AR58	W3110 <i>yeaP::scar</i>	Diese Arbeit
AR60	W3110 <i>yliF::scar</i>	Diese Arbeit
AR70	W3110 <i>yneF::scar</i>	Diese Arbeit
AR80	W3110 <i>yddU::scar</i>	Diese Arbeit
AR82	W3110 <i>yfeA::scar</i>	Diese Arbeit
AR86	W3110 <i>yhjK::scar</i>	Diese Arbeit
AR90	W3110 <i>ycgF::scar</i>	Diese Arbeit
AR92	W3110 <i>yjcC::scar</i>	Diese Arbeit
AR94	W3110 <i>yliE::scar</i>	Diese Arbeit
AR135	AR3110 <i>flhDC::kan</i>	Diese Arbeit
AR137	AR3110 <i>motA::kan</i>	Diese Arbeit
AR138	AR3110 <i>flgM::kan</i>	Diese Arbeit
AR152	AR3110 <i>hdfR::cm</i>	Diese Arbeit
AR182	AR3110 <i>bcsA::scar</i>	Diese Arbeit
AR187	AR3110 <i>rpoS::scar</i>	Diese Arbeit
AR188	AR3110 <i>csgD::scar</i>	Diese Arbeit
AR189	AR3110 <i>mlrA::scar</i>	Diese Arbeit
AR190	AR3110 <i>yhjH::scar</i>	Diese Arbeit
AR191	AR3110 <i>ydaM::scar</i>	Diese Arbeit
AR192	AR3110 <i>yciR::scar</i>	Diese Arbeit
AR193	AR3110 <i>yaiC::scar</i>	Diese Arbeit
AR194	AR3110 <i>yoaD::scar</i>	Diese Arbeit
AR195	AR3110 <i>mlrA::scar</i>	Diese Arbeit
AR196	W3110 <i>yoaD::scar</i>	Diese Arbeit
AR198	AR3110 <i>bcsA::scar csgB::scar</i>	Diese Arbeit
AR199	AR3110 <i>yegE::scar</i>	Diese Arbeit
AR200	AR3110 <i>yhjK::scar</i>	Diese Arbeit
AR201	W3110 <i>yaiC::scar</i>	Diese Arbeit
AR204	AR3110 <i>bcsQ::scar</i>	Diese Arbeit
AR213	AR3110 <i>yhjR::scar</i>	Diese Arbeit
AR215	W3110 <i>yhjR::scar</i>	Diese Arbeit
AR220	AR3110 <i>rtn::scar</i>	Diese Arbeit
AR221	AR3110 <i>yfiN::scar</i>	Diese Arbeit
AR222	AR3110 <i>ylaB::scar</i>	Diese Arbeit
AR223	AR3110 <i>ycgG::scar</i>	Diese Arbeit
AR224	AR3110 <i>ydiV::scar</i>	Diese Arbeit
AR225	AR3110 <i>yeal::scar</i>	Diese Arbeit
AR226	AR3110 <i>yahA::scar</i>	Diese Arbeit
AR227	AR3110 <i>ycdT::scar</i>	Diese Arbeit
AR231	AR3110 <i>yliE::scar</i>	Diese Arbeit
AR232	AR3110 <i>yliF::scar</i>	Diese Arbeit
AR233	AR3110 <i>yneF::scar</i>	Diese Arbeit
AR234	AR3110 <i>yeaP::scar</i>	Diese Arbeit
AR235	AR3110 <i>yeaJ::scar</i>	Diese Arbeit

AR236	AR3110 <i>ycgF::scar</i>	Diese Arbeit
AR237	AR3110 <i>yddU::scar</i>	Diese Arbeit
AR238	AR3110 <i>yddV::scar</i>	Diese Arbeit
AR239	AR3110 <i>ydeH::scar</i>	Diese Arbeit
AR240	AR3110 <i>yjcC::scar</i>	Diese Arbeit
AR241	AR3110 <i>yfeA::scar</i>	Diese Arbeit
AR242	AR3110 <i>yedQ::scar</i>	Diese Arbeit
AR243	AR3110 <i>yfgF::scar</i>	Diese Arbeit
AR244	AR3110 <i>yhdA::scar</i>	Diese Arbeit
AR260	AR3110 <i>yaiC::scar yhjK::scar</i>	Diese Arbeit
AR1000	AR3110 $\Delta lac(I-A)$	Diese Arbeit
AR270	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>yhjR::lacZ</i> ) <i>hybr.</i>	Diese Arbeit
AR271	AR110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>yhjR::lacZ</i> ) <i>hybr.</i>	Diese Arbeit
AR272	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS74$ ( <i>bcsA::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> W3110	Diese Arbeit
AR273	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS74$ ( <i>bcsQ::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> W3110	Diese Arbeit
AR274	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>bcsQ::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> AR3110	Diese Arbeit
AR275	AR3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS74$ ( <i>bcsA::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> W3110	Diese Arbeit
AR276	AR3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS74$ ( <i>bcsQ::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> W3110	Diese Arbeit
AR277	AR3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>bcsQ::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> AR3110	Diese Arbeit
AR278	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>bcsA::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> AR3110	Diese Arbeit
AR279	AR3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>bcsA::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> AR3110	Diese Arbeit
AR282	AR3110 <i>csgB::scar</i>	Diese Arbeit
AR283	AR3110 <i>fliC::scar</i>	Diese Arbeit
AR285	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>yhjR::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> <i>rpoS::cm</i>	Diese Arbeit
AR287	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>ARbcsQ::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> <i>rpoS::cm</i>	Diese Arbeit
AR289	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ ( <i>ARbcsA::lacZ</i> ) <i>hybr.</i> <i>rpoS::cm</i>	Diese Arbeit
AR315	AR3110 <i>yoaD::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR316	AR3110 <i>yhjH::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR317	AR3110 <i>ydaM::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR318	AR3110 <i>yciR::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR319	AR3110 <i>yaiC::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR320	AR3110 <i>ycgG::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR321	AR3110 <i>ydiV::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR322	AR3110 <i>yeal::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR323	AR3110 <i>yahA::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR324	AR3110 <i>yedT::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR325	AR3110 <i>yegE::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR326	W3110 <i>rtn::scar</i>	Diese Arbeit
AR327	AR3110 <i>yhjK::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR328	AR3110 <i>rtn::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR329	AR3110 <i>yfiN::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR330	AR3110 <i>ylaB::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR331	W3110 <i>ylaB::scar</i>	Diese Arbeit
AR332	W3110 <i>yfgF::scar</i>	Diese Arbeit



AR333	W3110 <i>ycgG::scar</i>	Diese Arbeit
AR343	AR3110 <i>yliE::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR344	AR3110 <i>yliF::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR345	AR3110 <i>yneF::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR346	AR3110 <i>yeaP::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR347	AR3110 <i>yeaJ::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR348	AR3110 <i>ycgF::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR349	AR3110 <i>yddU::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR350	AR3110 <i>yddV::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR351	AR3110 <i>ydeH::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR352	AR3110 <i>yjcC::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR353	AR3110 <i>yfeA::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR354	AR3110 <i>yedQ::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR355	AR3110 <i>yfgF::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR356	AR3110 <i>yhdA::scar csgB::cm</i>	Diese Arbeit
AR358	AR3110 <i>cheB::kan</i>	Diese Arbeit
AR360	AR3110 <i>ycgR::kan</i>	Diese Arbeit
AR361	AR3110 <i>fliA::cm</i>	Diese Arbeit
AR362	AR3110 <i>fliK::kan</i>	Diese Arbeit
AR363	AR3110 <i>fliZ::kan</i>	Diese Arbeit
AR372	AR3110 <i>cheA::scar</i>	Diese Arbeit
AR373	AR3110 <i>cheY::scar</i>	Diese Arbeit
AR387	AR3110 <i>cyaA::scar</i>	Diese Arbeit
AR388	W3110 <i>cyaA::scar</i>	Diese Arbeit
AR398	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar</i>	Diese Arbeit
AR400	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yhjK::cm</i>	Diese Arbeit
AR401	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar ycdT::cm</i>	Diese Arbeit
AR402	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar ycgG::cm</i>	Diese Arbeit
AR403	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yoaD::cm</i>	Diese Arbeit
AR404	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar ydiV::cm</i>	Diese Arbeit
AR405	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar ylaB::cm</i>	Diese Arbeit
AR406	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yaiC::cm</i>	Diese Arbeit
AR407	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yddU::kan</i>	Diese Arbeit
AR408	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yddV::kan</i>	Diese Arbeit
AR409	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yhjH::kan</i>	Diese Arbeit
AR410	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yfgF::kan</i>	Diese Arbeit
AR411	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar ycgF::kan</i>	Diese Arbeit
AR412	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yjcC::kan</i>	Diese Arbeit
AR413	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar ydeH::kan</i>	Diese Arbeit
AR414	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yhdA::kan</i>	Diese Arbeit
AR415	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yeaI::kan</i>	Diese Arbeit
AR416	AR3110 <i>yaiC-GGAAF</i>	Diese Arbeit
AR420	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda$ RS45 ( <i>csgB::lacZ</i> ) <i>hybr. ydaM::kan</i>	Diese Arbeit
AR421	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda$ RS45 ( <i>csgB::lacZ</i> ) <i>hybr. yciR::kan</i>	Diese Arbeit

AR422	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda$ RS45 ( <i>csgB::lacZ</i> ) <i>hybr. yaiC::cm</i>	Diese Arbeit
AR427	AR3110 <i>yaiC-GGAAF yhjK::cm</i>	Diese Arbeit
AR428	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yahA::kan</i>	Diese Arbeit
AR429	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yneF::kan</i>	Diese Arbeit
AR430	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar rtn::kan</i>	Diese Arbeit
AR431	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yfeA::kan</i>	Diese Arbeit
AR432	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yeaP::kan</i>	Diese Arbeit
AR433	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yeaJ::kan</i>	Diese Arbeit
AR434	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yegE::kan</i>	Diese Arbeit
AR435	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yliE::kan</i>	Diese Arbeit
AR436	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yedQ::kan</i>	Diese Arbeit
AR437	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yfiN::kan</i>	Diese Arbeit
AR438	AR3110 <i>yhjK-AAL</i>	Diese Arbeit
AR439	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda$ RS45 ( <i>csgB::lacZ</i> ) <i>hybr. yhjK::kan</i>	Diese Arbeit
AR440	AR3110 <i>ydaM::scar yciR::scar yliF::kan</i>	Diese Arbeit
AR441	AR3110 <i>yhjK</i> $\Delta$ <i>periplasma</i> (AS26-136)	Diese Arbeit
AR3110 KanR	<i>bcsQ</i> * Cellulose-positives Derivat von W3110, Kanamycin-Kassette zw. <i>yhjV</i> und <i>dppF</i>	Diese Arbeit

Die hier erwähnten „scar“-Mutanten sind durch One-Step-Inactivation hergestellte Gen-Deletionen, bei denen die entsprechende Antibiotika-Kassette unter Nutzung von pCP20 entfernt wurde (Datsenko & Wanner, 2000)(vgl. Kapitel 3.6.11). Zurück bleibt eine etwa 80 bp lange Narbe (*scar*), die noch eine FRT-Sequenz trägt.

**Tab. 2.** Liste der genutzten Bakteriophagen-Lysate

Lysat	Genotyp	Referenz
$\lambda$ RS45	Transduzierender Phage	Laborsammlung (Simons et al, 1987)
$\lambda$ RS74	Transduzierender Phage	Laborsammlung (Simons et al, 1987)
P1 W3110	Transduzierender Phage für W3110	Laborsammlung
P1 AR3110	Transduzierender Phage für AR3110	Diese Arbeit
P1 AR3110- <i>kanKass</i>	Transduzierender Phage für AR3110; Kan-Kassette zw. <i>yhjV</i> und <i>dppF</i>	Diese Arbeit

**Tab. 3.** Liste der genutzten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pKD46	Hilfsplasmid mit $\lambda$ -Red-Rekombinase-Systems; Promotor Arabinose-induzierbar ( <i>ParaB-<math>\gamma</math>-<math>\beta</math>-exo</i> ); Temp.-sensitives <i>ori</i> ; Amp <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)

pKD3	Template-Plasmid zum Amplifizieren der FRT-flankierten <i>cm</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp <sup>R</sup> ; Cm <sup>R</sup>	
pKD4	Template-Plasmid zum Amplifizieren der FRT-flankierten <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup>	
pKD13	Template-Plasmid zum Amplifizieren der FRT-flankierten <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup>	
pCP20	Hilfsplasmid mit FLP-Rekombinase, Promotor Temp.-induzierbar; Temp.-sensitives <i>ori</i> ; Amp <sup>R</sup>	
pKD45	Template-Plasmid zum Amplifizieren der FRT-flankierten <i>kan</i> -und <i>ccdB</i> -Kassette (Rhamnose-induzierbares <i>ccdB</i> -Toxin); <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup>	Laborsammlung, Geschenk AG Wanner
pCAB18	IPTG-induzierbarer Überexpressionsvektor mit p <sub>tac</sub> -kontrollierter MCS, Amp <sup>R</sup>	(Barembuch & Hengge, 2007)
pETDUET1	Überexpressionsvektor mit 2 MCSs unter der Kontrolle ein T7-abhängigen Promotors, Amp <sup>R</sup>	Merck (zuvor Novagen)
pKT25	Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit N-terminalen T25-Fragment der Adenylat-Zyklase von <i>B. Pertussens</i> ; Kan <sup>R</sup>	Geschenk AG Jenal; (Karimova et al, 1998)
pUT18	Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit C-terminalen T18-Fragment der Adenylat-Zyklase von <i>B. Pertussens</i> ; Amp <sup>R</sup>	
pUT18C	Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit N-terminalen T18-Fragment der Adenylat-Zyklase von <i>B. Pertussens</i> ; Amp <sup>R</sup>	
pKT25-zip	pKT25-Leucine-Zipper; Kontroll-Plasmid BTH	
pUT18C-zip	pUT18C-Leucine-Zipper; Kontroll-Plasmid BTH	
pMSP1E3D1	Überexpressionsplasmid für MSP1E3DE1; IPTG-induzierbar; Amp <sup>R</sup>	Geschenk AG Schneider; (Ritchie et al, 2009)
pQE60-CsgD	pQE60- <i>csgD</i> -6xHis (Amp <sup>R</sup> )	Doktorarbeit H. Weber
pNAT8	pCAB18- <i>dgcC</i> ( <i>yaiC</i> )	Doktorarbeit N. Tschowri
pNAT9	pCAB18- <i>pdeH</i> ( <i>yhjH</i> )	
pAR-R	pJL28-406nt vor <i>yhjR</i> -Start - 9. Codon <i>yhjR</i> ; Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit (Serra et al, 2013a)
pAR-QW	pJL28-406nt vor <i>yhjR</i> -Start - 18. Codon <i>bcsQ</i> [W3110-Sequenz (6.Codon=TAG-Stopp)]; Amp <sup>R</sup>	
pAR-QAR	pJL28-406nt vor <i>yhjR</i> -Start - 18. Codon <i>bcsQ</i> [AR3110-Sequenz (6.Codon=TTG-Stopp)]; Amp <sup>R</sup>	
pAR-AW	pJL28-406nt vor <i>yhjR</i> -Start - 10. Codon <i>bcsA</i> [W3110-Sequenz (6.Codon=TAG-Stopp)]; Amp <sup>R</sup>	
pAR-AAR	pJL28-406nt vor <i>yhjR</i> -Start - 10. Codon <i>bcsA</i> [AR3110-Sequenz (6.Codon=TTG-Stopp)]; Amp <sup>R</sup>	
pAR1	pCAB18- <i>dgcE</i> ( <i>yegE</i> )	Diese Arbeit
pAR2	pCAB18- <i>dgcQ</i> ( <i>yedQ</i> )	Diese Arbeit
pAR6	pETDUET1- <i>pdeD</i> (AS248-532)-Strep ( <i>yoaD</i> )	Diese Arbeit

pAR7	pETDUET1- <i>pdeD</i> (AS248-532)(EI301AA)-Strep	Diese Arbeit
pAR8	pETDUET1- <i>pdeK</i> (AS148-649)-Strep ( <i>yhjK</i> )	Diese Arbeit
pAR9	pETDUET1- <i>pdeK</i> (AS148-649)(EV431AA)-Strep	Diese Arbeit
pAR10	pETDUET1- <i>pdeK</i> (AS148-649)(E611A)-Strep	Diese Arbeit
pAR11	pETDUET1- <i>dgcC</i> (AS181-371)-Strep ( <i>yaiC</i> )	Diese Arbeit
pAR13	pETDUET- <i>pdeK</i> -Strep ( <i>yhjK</i> )	Diese Arbeit
pAR14	pETDUET- <i>dgcC</i> -Strep ( <i>yaiC</i> )	Diese Arbeit
pAR15	pETDUET- <i>dgcC</i> -His(2MCS)	Diese Arbeit
pAR16	pETDUET- <i>pdeK</i> -Strep(1MCS)- <i>dgcC</i> -His(2MCS)	Diese Arbeit
pAR17	pKT25- <i>dgcC</i> ( <i>yaiC</i> )	Diese Arbeit
pAR18	pKT25- <i>pdeD</i> ( <i>yoaD</i> )	Diese Arbeit
pAR19	pKT25- <i>pdeK</i> ( <i>yhjK</i> )	Diese Arbeit
pAR21	pKT25- <i>bcsA</i>	Diese Arbeit
pAR22	pKT25- <i>dgcC</i> (ΔAS201-372) del. Cyt.Domäne	Diese Arbeit
pAR23	pKT25- <i>pdeK</i> (ΔAS181-649) del. Cyt.Domäne	Diese Arbeit
pAR24	pKT25- <i>pdeK</i> (ΔAS26-136) del. peripl.Domäne	Diese Arbeit
pAR25	pKT25- <i>yaiC</i> (DE291AA) GGAAF ( <i>yaiC</i> )	Diese Arbeit
pAR27	pUT18- <i>dgcC</i> ( <i>yaiC</i> )	Diese Arbeit
pAR28	pUT18- <i>pdeD</i> ( <i>yhjD</i> )	Diese Arbeit
pAR29	pUT18- <i>pdeK</i> ( <i>yhjK</i> )	Diese Arbeit
pAR31	pUT18- <i>bcsA</i>	Diese Arbeit
pAR32	pUT18- <i>bcsB</i>	Diese Arbeit
pAR33	pUT18- <i>dgcC</i> (ΔAS201-372) del. Cyt.Domäne	Diese Arbeit
pAR34	pUT18- <i>pdeK</i> (ΔAS181-649) del. Cyt.Domäne	Diese Arbeit
pAR35	pUT18- <i>pdeK</i> (ΔAS26-136) del. peripl.Domäne	Diese Arbeit
pAR36	pUT18- <i>dgcC</i> (DE291AA) GGAAF	Diese Arbeit
pAR37	pUT18- <i>pdeK</i> (EV431AA) AAL	Diese Arbeit
pAR39	pUT18C- <i>pdeK</i> ( <i>yhjK</i> )	Diese Arbeit
pAR40	pKT25- <i>bcsB</i>	Diese Arbeit

### 3.5. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### 3.5.1. Sterilisation

Sofern nicht anders angegeben wurden Flüssigmedien und Festmedien durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 1 bar sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden unter Nutzung von Cellulosefiltern der Firma Roth (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert.

### 3.5.2. Wachstumsbedingungen

Soweit nicht anders erwähnt erfolgte die Anzucht von Bakterien auf Festmedien oder in Flüssigkulturen bei 28°C bzw. 37°C. Aerobes Wachstum in Flüssigkulturen wurde durch Inkubation der Kulturgefäße bei 130-300 rpm gewährleistet.

### 3.5.3. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Auf Festmedien ausgestrichene Stämme wurden maximal fünf Tage bei 4°C aufbewahrt und genutzt. Die längerfristige Lagerung erfolgte nach Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO, Endkonzentration 7%) bei -80°C.

### 3.5.4. Antibiotika

Stammlösungen von Antibiotika wurden bei -20°C aufbewahrt und in den angegebenen Konzentrationen (Tab. 4) verwendet.

**Tab. 4.** Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg / ml H <sub>2</sub> O	100 µg / ml
Chloramphenicol	15 mg / ml in 70% EtOH	15 µg / ml
Kanamycin	50 mg / ml H <sub>2</sub> O	50 µg / ml
Rifampicin	50 mg / ml H <sub>2</sub> O	50 µg / ml
Tetracyclin	10 mg / ml in 70% EtOH	10 µg / ml

### 3.5.5. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen erfolgte photometrisch bei 578 nm (im Folgenden OD<sub>578</sub>). Als Referenz wurde steriles Medium genutzt. Da ab einer OD<sub>578</sub> von 0,3 Zellzahl und optische Dichte nicht mehr linear zueinander sind, wurden die zu messenden Proben mit sterilem Medium verdünnt und die eigentliche Zelldichte unter Berücksichtigung des entsprechenden Verdünnungsfaktors ermittelt.

---

### 3.5.6. Herstellung eines P1-Lysates

Eine seit wenigen Stunden wachsende Bakterienkultur wurde mit einem Tropfen 1 M  $\text{CaCl}_2$  und mit zwei bis drei Tropfen *E. coli* W3110 P1-Wildtyp-Lysat versetzt und bis zur Zelllyse für weitere 4-8 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Lyse aller Zellen wurde die Kultur mit 10 Tropfen Chloroform versetzt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm wurde der Überstand in ein steriles Glasröhrchen überführt und nochmals 2-3 Tropfen Chloroform dazugegeben. Das so hergestellte Lysat konnte bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

### 3.5.7. P1-Transduktion

Als Transduktion bezeichnet man den Vorgang der Übertragung genetischen Materials durch Viruspartikel. Bakterien-spezifische Viren werden Phagen genannt. Im Bereich der Molekularbiologie kann man sich diesen Prozess der Genübertragung zwischen Bakterienstämmen zu Nutze machen. Eine Übernacht-Kultur wurde 1:100 in frischem LB verdünnt und bis zur  $\text{OD}_{578}$  0,5 inkubiert. Nach Zugabe von einem Tropfen 1M  $\text{CaCl}_2$  wurden 500  $\mu\text{l}$  in ein neues Reagenzglas überführt und mit 3-5 Tropfen Phagenlysat versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein Tropfen 1 M Natriumcitrat zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Roller inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf entsprechenden Selektionsplatten mit Antibiotika und Natriumcitrat ausplattiert und über Nacht bebrütet.

### 3.5.8. Untersuchungen zur Biofilmbildung auf Festmedien

Zur Anzucht von Makrokolonie-Biofilmen wurden Agarplatten mit 5  $\mu\text{l}$  einer Übernachtkultur der zu testenden Stämme inokuliert und nach mehrtägiger Inkubation unter dem Stereomikroskop fotografiert. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, sollten die verwendeten Platten 1-2 Tage vor Versuchsbeginn hergestellt und kurz vor Verwendung für 2-3 h bei 28-37°C getrocknet werden.

---

### **Congo-Rot-Bindung**

Congo-Rot und Comassie-Brilliant Blue G dienen der Anfärbung extrazellulärer Proteine und Polysaccharide, die als Bestandteil der Biofilmmatrix gebildet werden (Hammar et al, 1995). Die Inkubation von Makrokolonien erfolgte für 5-7 Tage auf LBnoS- bzw. Yesca-Medium mit Congo-Rot-Lösung (CR).

### **Calcofluor-Bindung**

Ein spezifischerer Nachweis von Exopolysacchariden wie Cellulose im Biofilm erfolgte durch Inkubation von Makrokolonien für 24-48 h auf Calcofluor-Platten (CF). Die Produktion von Cellulose konnte durch UV-Licht visualisiert werden.

### **3.5.9. Bestimmung der spontanen Mutationsfrequenz**

Mutationsraten wurden auf der Basis der spontanen Mutation hin zur Resistenz gegenüber Rifampicin ermittelt. Dreimal 100 µl einer Übernachtskultur wurden hierfür auf LB-Platten mit 50 µg/ml Rifampicin ausplattiert. Parallel dazu wurde die Lebendzellzahl der Kulturen in Abwesenheit des Antibiotikums bestimmt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und Kolonie-bildende Einheiten am Folgetag ermittelt.

## **3.6. Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **3.6.1. Verwendete Kits**

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des innuPREP Plasmid Mini Kits (Analytik Jena). Die Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) durchgeführt. Aufreinigung von PCR-Produkten oder Restriktionsverdaus erfolgte durch ein QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Die Durchführungen richteten sich nach den Angaben der Hersteller.

### 3.6.2. Isolierung chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli* wurden 200 µl einer Übernacht-Kultur abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst und zur Lyse der Zellen für fünf Minuten gekocht. Ein nachfolgender Zentrifugationsschritt für 5 min trennte Zelltrümmer von löslichen Bestandteilen wie Nukleinsäuren und cytosolischen Proteinen. Die Trennung von DNA und sonstigen Zellbestandteilen erfolgte durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation bei mind. 12000 rpm für 10 min. Die wässrige DNA-haltige Phase konnte anschließend bei -20°C gelagert und in PCR-Reaktionen verwendet werden.

### 3.6.3. Verwendete Oligonukleotide

Alle Primer zur Herstellung von Mutanten oder zur Kontrolle auf Vorhandensein von Antibiotika-Kassetten beziehen sich auf das Protokoll von Datsenko & Wanner (2000). Sämtliche Oligonukleotide wurden bei Metabion synthetisiert.

**Tab. 5.** Primer zur Herstellung von chromosomalen Knockout-Mutanten

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Verwendung
<i>bcsA</i> H1P1	tcaacgcgcggcttatcgggcggtatcgcgattatcgctgcacgggtcg <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>	Herstellung <i>bcsA</i> -Mutante
<i>bcsA</i> H1P2	gcggaataaacgatacaaccaggaaccagagaagtgcacacacgg <b>aatcatatgaatatcctccttag</b>	
<i>bcsC</i> H1P1	gcaccaaccgctcagcaacagttgctggagcaagttcggttaggcgaa <b>gcgtgtaggctggagctgcttc</b>	A.Possling; Herstellung <i>bcsC</i> - Mutante
<i>bcsC</i> H2P4	gaagtaacacgtcgttcaagtaatgccgcgccgtgtagccgaagccct <b>gattccggggatccgctgacc</b>	
<i>bcsZ</i> H1P1	ctttagtgttcaggcagcctgtacctggcctgcctgggagcagtttaaaa <b>agggtgtaggctggagctgcttc</b>	A.Possling; Herstellung <i>bcsZ</i> - Mutante
<i>bcsZ</i> H2P4	gttgatcccagccttgccaacagggtcagcacatagttgtaataggca <b>tcattccggggatccgctgacc</b>	
<i>bcsQ</i> H1P1	tggccgtactgggatagcaggggggtgcggggaggcgtggggacaac <b>aaccgtgtaggctggagctgcttc</b>	Herstellung <i>bcsQ</i> -Mutante
<i>bcsQ</i> H2P2	tggtaggttatctgcgaggcatcacgcggaagtgcattaaaatccact <b>gcatatgaatatcctccttag</b>	
Cell <i>Kan</i> H1P1	ctatgcttgcgcactgttgaaagctgattgagtaaaccggagcgcag <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>	Integration <i>Kan</i> -Kassette zw. <i>yljV</i> und <i>dppF</i>
Cell <i>Kan</i> H2P4	tgttttgcgttgatcaggatgaaaatccgcagcgtaactcacaac <b>cattccggggatccgctgacc</b>	



<i>cheB</i> H1P1	cgcttcacgctgcgtggcagacgggtgatgcgctaagtaaggattaac <b>ggtgtaggctggagctgcttc</b>	Herstellung <i>cheB</i> -Mutante
<i>cheB</i> H2P4	cggcactaatttttgccaacatttgctggcttacctggctaagatcgaccat <b>tccggggatccgctgacc</b>	
<i>cyaA</i> H1P1	gatgttggcgggaatcacagtcatgacgggtagcaaatcaggcgatacg <b>tcgtgtaggctggagctgcttc</b>	Herstellung <i>cyaA</i> -Mutante
<i>cyaA</i> H2P4	ccgctaagattgcatgccggataagcctcgctttccggcacgttcacattc <b>cggggatccgctgacc</b>	
<i>flgM</i> H1P1	ccgataaataagcaacacatgataaaagcgcctcaatgaggaataaa <b>ccgtgtaggctggagctgcttc</b>	Herstellung <i>flgM</i> -Mutante
<i>flgM</i> H2P4	Gtcttgctgcgcttcgttgatcagcgcatcggcaattttgccggtgcat <b>tccggggatccgctgacc</b>	
<i>fliA</i> H1P1	taatcatgccgataactcatataacgcagggtgtttatc <b>gtgtaggctg gagctgcttc</b>	Herstellung <i>fliA</i> -Mutante
<i>fliA</i> H2P2	aactctggtagtcaaagttaaagtgcggcattactgaccatgaatat <b>cctccttag</b>	
<i>fliK</i> H1P1	gatggatgagttcgcccagcgcgcccatgaggaaacctgaatgatt <b>cgtgtaggctggagctgcttc</b>	Herstellung <i>fliK</i> -Mutante
<i>fliK</i> H2P2	gagcgcaacaagcggggaaaagacgcggattacggtgctaccttg acg <b>catatgaatatcctccttag</b>	
<i>yddV</i> H1P1	cataggaattccggtagaaattgtcgagatggggtttcggg <b>gtgtaggct ggagctgcttc</b>	F. Mika; Herstellung <i>dgcO</i> - Mutante ( <i>yddV</i> )
<i>yddV</i> H2P4	catcggttagcttcattgattacctctgcatcctggcgcat <b>attccggggat ccgctgacc</b>	
<i>yhjR</i> H1P1	atgaataacaatgaaccagatactctgcctgatcccgcataggctatat <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>	Herstellung <i>yhjR</i> -Mutante
<i>yhjR</i> H2P2	ctactttgttgcgcaaacctctgccagcaacggccagcgttttaatgccgc <b>atatgaatatcctccttag</b>	

Der fett geschriebene Teil der H1P1-bzw. H2P2/H2P4-Primer entspricht der Region auf pKD3, pKD4 oder pKD13.

Die Herstellung von Deletions-Mutanten aller übrigen in Tabelle 1 erwähnten Leseraster erfolgte unter Nutzung der bereits veröffentlichten Oligonukleotide: *csgD::cm*, *mlrA::kan*, *yaiC::kan*, *ydaM::kan*, *yciR::kan*, *yedQ::cm*, (Weber et al., 2006); *flhDC::kan*, *fliZ::kan*, *ycgR::kan*, *yegE::kan*, *yeaJ::kan*, *yhjH::cm* (Pesavento et al., 2008); *rtn::kan*, *ycdT::cm*, *ycgF::kan*, *ycgG::cm*, *yddU::kan*, *ydeH::kan*, *ydiV::kan*, *yeal::cm*, *yeaP::kan*, *yfeA::kan*, *yfgF::kan*, *yfiN::cm*, *yhdA::kan*, *yhjK::cm*, *yjcC::kan*, *ylaB::kan*, *yliE::kan*, *yliF::kan*, *yneF::kan*, *yoad::kan* (Sommerfeldt et al., 2009). *yahA::cm* (Klauck & Hengge, unveröffentlicht). *bcsE::kan*, *bcsF::kan*, *bcsG::kan* (Richter et al, 2014).

**Tab. 6.** Primer zur Herstellung von chromosomalen Punktmutanten

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Verwendung
<i>bcsQ</i> HP1	ctgcctgatcccgcataggtatatttccagaatgatattgtgg <b>cgtttcagaagaactcgtcaagaag</b>	Amplifizierung <i>Kan-ccdB</i> -Kassette <i>pkd45</i>
<i>bcsQ</i> HP2	tagcgcaaccagcgtcacgccagtctggccatccagcatcgct <b>ctggccggatattatcgtgaggatg</b>	
<i>bcsQ</i> t up	catgaacggtacggtatttcatag	Testprimer & Amplifizierung Mut-Fragment 1
<i>bcsQ</i> t down	caaaaggcagcaaatcgag	Testprimer & Amplifizierung Mut-Fragment 2
<i>bcsQ</i> mut1	ctgggatTgcaggggg	Mutagenese-Primer A(-8bp)→ T; Kombination mit t up & mut2/ mut1 & t down
<i>bcsQ</i> mut2	ccctgcaAtcccagtag	
<i>bcsQ</i> Seq1	gtcacaagacgtgtgatttag	Sequenzierprimer
<i>bcsQ</i> Seq2	gcagttggcatccacatt	
<i>yaiC</i> H1P45	ggatcatgagtaccgcgacggcatgacggcggtataaccga <b>cgttcagaagaactcgtcaagaag</b>	Amplifizierung <i>Kan-ccdB</i> -Kassette <i>pKD45</i>
<i>yaiC</i> H2P45	gtccggctttcttctgtttaaagcgccaaatctgccgatttcaac <b>caccggatattatcgtgaggatg</b>	
<i>yaiC</i> t up	gccttgtcacctcgagc	Testprimer & Amplifizierung Mut-Fragment 1
<i>yaiC</i> t down	agtgatcgaagcgatgacgaag	Testprimer & Amplifizierung Mut-Fragment 2
<i>yaiC</i> mut1	gattggctcggttggcgcgCtgCgttgcagtaacatgtccg gtac	Mutagenese-Primer A-Site (GGDEF→ GGAAF) AS DE291AA; Kombination mit t up & mut2/ mut1 & t down
<i>yaiC</i> mut2	gtaccggacatgattactgcaaacGcaGcgccgcaaaccgac caatc	
<i>yaiC</i> Seq1	gatgattatgtgtctgaatttgatg	Sequenzierprimer
<i>yaiC</i> Seq2	cgcaaaaatgggtgctgaaa	
<i>yhjK</i> H1P45-vo	agcgctctcttaatgccgctgcgatcgggtatactgggcgga <b>atctcagaagaactcgtcaagaag</b>	Amplifizierung <i>Kan-ccdB</i> -Kassette <i>pKD45</i>
<i>yhjK</i> H1P45	ctttgtgtcattgccaacggtgtacaggaaccgtggcacgcaat <b>cacctcagaagaactcgtcaagaag</b>	Verwendung von H1P45 für AAL-Mutation/ H1P45-vo für Deletion Peripl. Domäne
<i>yhjK</i> H2P45	cagacaacatcacagaaatgtactggatcataattgaa <b>accgg</b> <b>atattatcgtgaggatg</b>	
<i>yhjK</i> t up-peri	cgtacgttattccgccgc	Testprimer Deletion peripl. Domäne in Kombination mit <i>yhjK</i> t down
<i>yhjK</i> t up-AAL	cgtacgttattccgccgc	Testprimer & Amplifizierung Mut-Fragment 1
<i>yhjK</i> t down	gtaaaaccacaggtcttgaagg	Testprimer & Amplifizierung Mut-Fragment 2
<i>yhjK</i> mut fw	ggtaaacgtgctagtcggCagCgttactgcgtatccagcaac cggatg	Mutagenese-Primer A-Site (EVL→AAL) AS EV430AA; Kombination mit t up & mut2/ mut1 & t down
<i>yhjK</i> mut rev	catccggttgcgtgatacgagtaacGctGccgcactgaccagt ttacc	

<i>yhjK</i> Seq1	ctggtttgttgccacggc	Sequenzierprimer
<i>yhjK</i> Seq2	gcttaacgaagccgtcgccaag	

Fett hervorgehoben sind die Sequenzabschnitte, die homolog mit dem verwendeten Plasmid pKD45 sind. In Großbuchstaben hervorgehoben sind die mutierten Nukleotide.

Zur Herstellung der chromosomalen *pdeK*-Periplasma-Deletion wurde ein 1790 bp langes synthetisch hergestelltes PCR-Fragment genutzt (GeneArt life technologies), welches den 5'-Bereich des *pdeK*-Leserahmens umfasst, jedoch ohne die Tripletts 26-136, deren benachbarte Tripletts durch Unterstrich hervorgehoben wurden:

5' -atgGTGGCAGCCGTTGTCCTGGTGTTTCGTTTTTATTTTTTGCACCGTTTTGCTGTTCCATCTG  
GTCCAGCAGAAAT TATAAGTTCGTGATGAGCACC . . . . . AGACCTGTGGTTTTACT-3'

**Tab. 7.** Primer zur Herstellung translationaler *lacZ*-Fusionen

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Verwendung
<i>yhjR</i> <i>EcoRI</i>	gctcagGAATTCtgattgccagactgatagc	Upstream-Primer für <i>yhjR/bcsQ/bcsA::lacZ</i> -Fusionen
<i>yhiR</i> <i>HindIII</i>	gcAAGCTTgcagagtatctggttcatt	Downstream-Primer <i>yhjR::lacZ</i>
<i>bcsQ</i> <i>HindIII</i>	gcAAGCTTgatggtgtgtccccacggc	Downstream-Primer <i>bcsQ::lacZ</i>
<i>bcsA</i> <i>HindIII</i>	gcAAGCTTggataagcaaccacgggtcag	Downstream-Primer <i>bcsA::lacZ</i>

In Großbuchstaben hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen.

**Tab. 8.** Primer für die BTH-Klonierung

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Verwendung
<i>bcsA</i> <i>XbaI</i>	gctcagTCTAGAgagtatctgacccggtggtgcttacc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>bcsA</i> <i>KpnI</i>	gctcagGGTACCggtgttgagccaaagcctgatccgatgg	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>bcsB</i> <i>XbaI</i>	gctcagTCTAGAgaaaagaaaactattctggattgtg	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>bcsB</i> <i>KpnI</i>	gctcagGGTACCgctctgttatccgggttaagacgacgacgac	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>bcsQ</i> <i>XbaI</i>	gctcagTCTAGAggccgtactgggattgcagggggtgcgggg	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>bcsQ</i> <i>KpnI</i>	gctcagGGTACCggtgatgcactcccactggcggtttcagccc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>yaiC</i> <i>XbaI</i>	gctcagTCTAGAgttccaaaaataatgaatgatgaaaacttttcaaaaagcggc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>yaiC</i> <i>KpnI</i>	gctcagGGTACCggggccgcccacttcggtgcggttacgtccggctttctttgc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>yaiC</i> <i>mem KpnI</i>	gctcagGGTACCcgcgccagtttggttgcgctc	Del. AS200-371
<i>yhjK</i> <i>XbaI</i>	gctcagTCTAGAggtggcagccgtgtctggtgttcgtttttttttgaccg	ganzer ORF auf pKT25/pUT18

<i>yhjK KpnI</i>	gcacagGGTACCCgcttttctccaggtactctctcgaagatttc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>yhjK mem KpnI</i>	gctcagGGTACCCgaagttcgcgagcaatattgc	Del. AS181-469
<i>yhjR XbaI</i>	gctcagTCTAGAGaataacaatgaaccagatactc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>yhjR KpnI</i>	gctcagGGTACCCgcttttgttgcgcaaaactctgccagcaac	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>yoaD XbaI</i>	gctcagTCTAGAGcaaaaagcacaacggatcattaaaacc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18
<i>yoaD KpnI</i>	gctcaGGTACCCgacgtaacggcataatggcggtgatgtcc	ganzer ORF auf pKT25/pUT18

In Großbuchstaben hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen.

**Tab. 9.** Primer zur Klonierung von Überexpressionsplasmiden

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Verwendung
<i>yegE CAB EcoRI</i>	cgGAATTCaggaggtactgagatgagcaacaatcacagcatg	Klonierung pCAB18 <i>dgcE</i>
<i>yegE CAB HindIII</i>	cgtgacAAGCTTtcagttaatcgcgaaataactac	
<i>yedQ CAB EcoRI</i>	cgGAATTCaggaggtactgaggtgcagcacgagacaaaaatgg	Klonierung pCAB18 <i>dgcQ</i>
<i>yedQ CAB HindIII</i>	cgtgacAAGCTTttaagcgttatcgctcgcgaatacccg	
<i>yaiC orf NcoI fw</i>	gacCCATGGtcccaaaaataatgaatgatg	pETDUET1-1MCS; gesamter ORF <i>dgcC</i> mit C-terminalem Strep-Tag
<i>yaiC EcoRI C-Strep rev</i>	gacGAATTCtattattttcgaactgcgggtggctccaggcgccggcgcacttcggtgc	
<i>YaiC NdeI N</i>	ccgcCATATGttcccaaaaataatgaatgatgaaaac	pETDUET1-2MCS; gesamter ORF <i>dgcC</i> mit C-terminalem 6xHis-Tag
<i>YaiC KpnI C-His</i>	ccgcGGTACCTcagtggtgatgatggtgatggccggcgccgcca cttcggtgcggttac	
<i>yoaD248 NcoI fw</i>	gacCCATGGtgctgctaagtttactgg	pETDUET1-1MCS; cytopl. Teil <i>pdeD</i> mit C-terminalem Strep-Tag
<i>yoaD EcoRI C-Strep rev</i>	gacGAATTCtattattttcgaactgcgggtggctccaggcgccac gtaacggcataatgggc	
<i>yhjK NcoI fw</i>	gacCCATGGtggcagccgtgtctctggtgttc	pETDUET1-1MCS; gesamter ORF bzw. cytopl. Teil <i>pdeK</i> mit C-terminalem Strep-Tag
<i>yhjK148 NcoI fw</i>	gacCCATGGtcgcatcagctggtgcattaac	
<i>yhjKEcoRI C-Strep rev</i>	gacGAATTCtattattttcgaactgcgggtggctccaggcgccctt ttcttcaggttaactc	

In Großbuchstaben hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen.

**Tab. 10.** Sonstige Primer

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Verwendung
<i>yhjK mutE fw</i>	gccgaaggcgtggCgactgaagcacaacg	Mutagenese kat. E E611A auf pETDUET1- <i>pdeK</i> -Strep; Kombination
<i>yhjK mutE rev</i>	cgttgtgcttcagtcGccacgccttcggc	

		<i>yhjK148</i> <i>NcoI</i> fw & mutE rev/ mutE fw & <i>yhjKEcoRI</i> C-Strep rev
<i>yhjK</i> peri fw	gctgttccatctggtccagcagaattataagttcgtg atgagcaccctctc	Deletion periplasmatische Domäne $\Delta$ AS26-135 auf <i>pdeK</i> -BTH-Plasmiden;
<i>yhjK</i> peri rev	attctgctggaccagatgg	Kombination <i>yhjK</i> <i>XbaI</i> & mutE rev/ mutE fw & <i>yhjK</i> <i>KpnI</i>
<i>yoaD</i> mut fw	cagcaatgtattggtgtagCgattttgctggcctgg aacaatccgcgtcag	Mutagenese A-Site (EIL $\rightarrow$ AIL) auf pETDUET1; Kombination <i>yoaD</i> 248
<i>yoaD</i> mut rev	ctgacgcggattgttcaggccagcaaaatcGcta caccaatacattgctg	<i>NcoI</i> fw & mut rev/ mut fw & <i>yoaD</i> <i>EcoRI</i> C-Strep rev
K1	cagtcatagccgaatagcct	Interner Testprimer Kan-Kassette (pKD4/13) für OSI
K2	cggcgccctgaatgaactgc	
C1	ttatacgcaaggcgacaagg	Interner Testprimer Cm-Kassette (pKD3) für OSI
C2	gatcttcggtcacaggtagg	
<i>ccdB</i> fw	gccgaatagcctctccaccc	Testprimer <i>ccdB</i> -Kassette (pKD46)
Cell <i>Kan</i> t1	gttgacgatttgggttctgttc	Testprimer upstream/ downstream der <i>Kan</i> -Kassette zw. <i>yhjV</i> - <i>dppF</i>
Cell <i>Kan</i> t2	gcgccatccgtacactcag	
pTI-211	ggcaaatattctgaaatgagc	Testprimer für Insert-PCR pCAB18
pTI-212	cgtttcacttctgagttcg	
pET t up	atgcgtccggcgtaga	Testprimer für Insert-PCR pETDUET1; 1MCS
pET t down	gattatgcggccgtgtacaa	
KT25 up1	gatttcgagggcggtcaagggtg	Testprimer für Insert-PCR pKT25
KT25 down2	gacgttgtaaaacgacggcc	
UT18 up1	cacacaggaaacagctatg	Testprimer für Insert-PCR pUT18
UT18 down2	gcgcgagcgattttccac	
UT18C up1	cgcagtggaacgccactgc	Testprimer für Insert-PCR pUT18C
UT18C down2	ctgtaagcggatgccggg	

In Großbuchstaben hervorgehoben sind die mutierten Nukleotide (*yhjK*/*yoaD* mut). Durch Unterstreichen ist die Position hervorgehoben, zwischen der sich der deletierte Bereich befand (*yhjK* peri fw).

### 3.6.4. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Durch entsprechende Primer können auch Restriktionsschnittstellen oder beliebige andere DNA-Sequenzen an Genfragmente angefügt werden. Die Reaktionen wurden in 50  $\mu$ l-Ansätzen nach den Angaben von (Sambrook et al, 1989) mit Pfu- bzw. Opti-Taq-Polymerasen (Roboklon) durchgeführt, wobei ein Ansatz folgendermaßen zusammengesetzt war: 0,7-1  $\mu$ l Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l), 1 mM dNTPs (MP Biomedicals), 1x Polymerase-Puffer (nach Angaben des Herstellers), je 1  $\mu$ M Primer 1 bzw. 2, 1  $\mu$ l

---

chromosomale oder Plasmid-DNA als Template bzw. 5-10 µl einer Bakteriensuspension und bidestilliertes Wasser.

### **3.6.5. Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt-PCR**

Zielgerichtete Mutationen im Chromosom oder in Plasmid-kodierten Genen wurden durch eine zweistufige PCR unter Verwendung von zwei Primer-Paaren durchgeführt. Dabei schließen zwei Primer, die stromaufwärts und stromabwärts des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts binden, die zu mutierende Region ein. Zwei weitere einander komplementäre Primer tragen die gewünschte Mutation (in Tab. 6 & 10 mit „mut1“ bzw. „mut2“) und wurden in zwei parallelen PCR-Ansätzen mit jeweils einem der oben genannten stromaufwärts bzw. stromabwärts-Primern kombiniert. Ergebnis dieser ersten beiden PCRs waren zwei einander überlappende PCR-Fragmente, die nach Elution aus dem Agarosegel im Verhältnis 1:1 für eine zweite PCR mit den Primern eingesetzt wurden, die das zu mutierende Genfragment einschließen (nicht die Mutagenese-Primer). Das Produkt dieser zweiten PCR konnte nach Elution aus einem Agarosegel mit Restriktionsenzymen verdaut bzw. direkt für Transformationen verwendet werden.

### **3.6.6. Agarose-Gelelektrophorese**

Um DNA-Fragmente gemäß ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurden diese zunächst mit 6x Gelauftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel (in TAE) für 40-60 min bei 80-100 V. Als Referenz diente 100bp-extended Marker (Roth). Die anschließende Einfärbung der DNA-Fragmente erfolgte für 20 min in Ethidiumbromid (1% in H<sub>2</sub>O) bzw. GelRed (Genaxxon, 0,001% in H<sub>2</sub>O), welche doppelsträngige DNA binden und unter UV-Licht sichtbar machen.

---

<b>6x Gelauftragsbuffer</b>	Bromphenolblau	0,25%	
	Xylencyanol	0,25%	
	Glycerin	30%	Gelöst in 1x TAE.
<b>50x TAE-Puffer</b>	Tris	242 g	
	Eisessig	57,1 ml	
	0.5 M EDTA pH 8	100 ml	

mit bidestilliertem Wasser auf 1 l auffüllen und bei Verwendung als Lauf- oder Gelpuffer für Gelelektrophoresen auf einfache Konzentration verdünnen.

### 3.6.7. Restriktionsverdau

Für den Verdau von chromosomaler DNA, PCR-Produkten oder Plasmiden wurden Restriktionsenzyme (NEB) gemäß den Herstellerangaben bezüglich Inkubationszeit (60-120 min bei 37°C) und Puffer genutzt. Zum Entfernen von Puffersalzen und Enzymen wurden die Ansätze mittels eines PCR-Purification-Kits (Quiagen) entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Ein Verdauungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<b>35 µl-Ansatz für PCR-Produkte:</b>	<b>25 µl-Ansatz für Plasmide:</b>
3,5 µl 10xPuffer	2,5 µl 10xPuffer
je 0,5 µl Restriktionsenzym	je 0,5 µl Restriktionsenzym
28 µl aufgereinigtes PCR-Produkt	4 µl Plasmid-DNA
2,5-3 µl H <sub>2</sub> O	17,5-18 µl H <sub>2</sub> O

### 3.6.8. Ligation von Insert und Vektor

Die Ligation von entsprechend verdauten PCR-Produkten und Plasmid-DNA erfolgte unter Nutzung von T4-Polymerase (NEB) und dem empfohlenen Reaktionspuffer in 15 µl-Ansätzen. Inkubationszeit und -temperatur variierten je nach Vektor und Insert: eine Stunde bei Raumtemperatur; für 16 h bei 18°C oder für 72 h bei 4°C.

---

### 3.6.9. Elektrotransformation

**Herstellung elektrokompenter Zellen.** Sollten die Zellen für die Mutagenese mittels der Datsenko & Wanner-Methode genutzt werden, mussten sie zuvor mit pKD46 (Amp<sup>R</sup>) transformiert werden. Da es sich hier um ein Plasmid mit Hitze-sensitivem *Origin of Replication* handelt, erfolgte die Inkubation bei 28°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5-0,8. Eine anschließende Induktion des  $\lambda$ -Red-Rekombinase-Systems erfolgte mit 10 mM Arabinose für 30 min. Für alle anderen elektrokompenten Zellen (z. B. zur Verwendung im BTH-Assay) erfolgte die Inkubation bei 37°C. Die Zugabe von Arabinose entfiel in diesen Fällen. Die weiteren Schritte waren bei der Herstellung jeglicher Art elektrokompenter Zellen identisch. Nach Inkubation wurden die Zellen für 30 min auf Eis gekühlt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 12 min bei 6000 rpm und 4°C und Medium-Rückstände durch zweimaliges Waschen der Zellen mit H<sub>2</sub>O entfernt. Im Anschluss wurde das Pellet in 0,002fachen Kulturvolumen Glycerin (10%) gelöst und in vorgekühlte Eppendorfgefäße zu Aliquots à 50-200  $\mu$ l aufgeteilt. Die elektrokompenten Zellen konnten so bei -80°C gelagert werden.

**Elektroporation.** 30-50  $\mu$ l elektrokompenter Zellen wurden zusammen mit 1-5  $\mu$ l DNA in gekühlte Elektroporationsküvetten (Biozym) überführt und mit einem Stromstoß für 4 msec behandelt. Anschließend wurden die Zellen in 500  $\mu$ l SOC-Medium überführt und für 60 min bei 28°C bzw. 37°C inkubiert und im Anschluss auf Selektionsplatten ausplattiert.

### 3.6.10. TSS-Transformation

Die TSS-Transformation diente dem Einbringen aufgereinigter Plasmid-DNA in Zellen. Hierfür wurden 200  $\mu$ l einer seit 2-3 Stunden wachsende Bakterienkultur mit gleichem Volumen 2x TSS-Medium und 1-3  $\mu$ l Plasmid-DNA für 30 min auf Eis und im Anschluss für 60 min bei 28°C bzw. 37°C inkubiert. Positive Transformanten wurden durch Inkubation auf Selektionsplatten identifiziert.



---

### 3.6.11. Inaktivierung chromosomaler Gene zur Erzeugung von Knockout-Mutanten nach Datsenko & Wanner

Unter Nutzung des  $\lambda$ -Red-Rekombinase-Systems sollten PCR-amplifizierte Kanamycin-bzw. Chloramphenicol-Resistenzen ins bakterielle Genom von *E. coli* inseriert werden. Das  $\lambda$ -Red-Rekombinase-System kodiert für die Gene  $\gamma$  (Gam),  $\beta$  (Bet) und *exo* (Exo), deren Expression durch einen Arabinose-induzierbaren  $P_{\text{araB}}$  - Promotor kontrolliert wird. Gam hemmt die wirtseigene Exonuclease V, die der Degradation linearer DNA dient. Die Genprodukte Bet und Exo begünstigen die Rekombination zwischen der eingebrachten DNA und dem bakteriellen Chromosom (Datsenko & Wanner, 2000).

Für die PCR-Amplifikation der betreffenden Antibiotika-Resistenz-Kassette wurden Primer mit einer Länge von 60-70 bp genutzt, wobei 40-50 bp Start- und Stop-Region des zu deletierenden Genes entsprechen (H1 und H2). Die übrigen 20 bp entsprechen der Sequenz des zur Amplifikation genutzten Plasmids (pKD3/pKD4/pKD13)(P1 und P2). Die Transformation der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte in elektrokompente Zellen, die das induzierte pKD46-Plasmid trugen und damit die Gene des  $\lambda$ -Red-System Rekombinase-Systems bereits exprimieren. Durch Selektion auf Antibiotika-Platten konnten im Anschluss die Transformanten ermittelt werden, die die entsprechende Kanamycin-/Chloramphenicol-Resistenz trugen und durch Verlust des Helferplasmids pKD46 sensitiv gegenüber Ampicillin waren. Eine weitere Überprüfung erfolgte mittels PCR-Nachweis der Resistenz-Kassette im Genom. Um etwaige sekundäre Mutationen durch das  $\lambda$ -Red-Rekombinase-System zu verringern, wurde vom so gewonnenen Antibiotika-resistenten Stamm ein Lysat hergestellt und mit diesem ein „frischer“ K-12-Stamm transduziert.

Wenn nötig konnte die Antibiotika-Resistenz unter Nutzung des Helferplasmids pCP20 entfernt werden. pCP20 kodiert für eine Temperatur-sensitive FLP Rekombinase, die mit den die Antibiotika-Kassette flankierenden FRT-Sequenzen interagiert.

---

### 3.6.12. Generierung von Punktmutationen im Chromosom

Zur Generierung von chromosomalen Punktmutationen wurde ein ähnliches Prinzip wie das eben erläuterte angewendet: als Template-DNA zur PCR-Amplifikation diente hier jedoch pKD45, welches für eine Kanamycin-Resistenz und ein durch Rhamnose induzierbares Toxin (*ccdB*) kodiert. Die HP-Primer waren ebenfalls nach dem Datsenko & Wanner-Protokoll aufgebaut, wobei der P-Teil komplementär zur pKD45-Sequenz ist und die H-Bereiche eine geeignete DNA-Region erfassen, in der die Punktmutation(en) generiert werden sollten. Nach Elektroporation von *E. coli* (mit induziertem  $\lambda$ -Red-Rekombinase-System) erfolgte die Selektion auf Kanamycin. Zusätzlich wurden die erhaltenen Transformanten auf Rhamnose-Sensitivität getestet und das Vorhandensein von *Kan*- und *ccdB*-Kassette im Chromosom mittels PCR verifiziert. Lysatherstellung und Transduktion erfolgten simultan zum oben beschriebenen Protokoll. Die Kanamycin-resistenten und Rhamnose-sensitiven Zellen wurden erneut mit pKD46 transformiert, die Plasmid-kodierten Gene mit Arabinose induziert und zur Herstellung elektrokompenter Zellen genutzt. Eine zweite Elektroporation erfolgte mit dem entsprechenden PCR-Fragment, welches die gewünschte Mutation trägt (vgl. Kapitel 3.6.5). Die Selektion dieser zweiten Transformation erfolgte auf M9-Platten unter Nutzung von Rhamnose als einziger Kohlenstoffquelle und gleichzeitigem Resistenz-Marker, um den Verlust der *ccdB*-Toxin-Kassette (und der Kanamycin-Resistenz) zu gewährleisten. Die korrekte DNA-Sequenz entsprechender Transformanten wurde durch Sequenzierung des mutierten Bereiches verifiziert.

### 3.6.13. Herstellung translationaler *lacZ*-Fusionen und deren Kreuzung ins Chromosom

In dieser Arbeit wurden *lacZ*-Reporterfusionen von *yhjR*, *bcsQ* und *bcsA* hergestellt, die alle Teil des *yhjR-bcsQABZC*-Operons sind. Da somit alle unter der Kontrolle eines Promotors liegen, wurde für die Konstruktion der *lacZ*-Reporterfusionen der gleiche stromaufwärts-Primer *yhjR-EcoRI* verwendet, der 406 bp vor dem *yhjR*-ORF

bindet. Die hergestellte *yhjR::lacZ*-Fusion umfasst diesen Promotor-Bereich und die ersten neun Codons von *yhjR*. *bcsQ::lacZ* schließt ebenfalls diesen Bereich ein, das gesamte *yhjR*-Leseraster und die ersten 18 Codons von *bcsQ* (ausgehend von der AR3110-Sequenz) und *bcsA::lacZ* den Promotorbereich, *yhjR*, *bcsQ* und die ersten zehn Codons von *bcsA* (vgl. Abb. 7). Mittels der verwendeten Primer wurden zusätzlich *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen für die anschließende Klonierung in pJL28 eingefügt, welches für *lacZ* kodiert (Tab. 7)(Lucht et al, 1994). Das so entstandene Konstrukt konnte mit Hilfe von  $\lambda$ RS45- bzw.  $\lambda$ RS74-Lysaten ins bakterielle Chromosom von *E. coli* K-12  $\Delta lacI-A$  an der *att*-Site eingekreuzt und die erhaltenen Klone mittels Test-PCR auf einfache Lysogenie untersucht werden (Powell et al, 1994; Simons et al, 1987).

### 3.7. Biochemische Arbeitsmethoden

#### 3.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach (Laemmli, 1970) unter Nutzung von Acrylamid-Gelen (Tab. 11). Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt und vor der Auftragung für 10 min bei 95°C erhitzt und mit 20 mA pro Gel (5x10 cm) für 60 min in SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer aufgetrennt.

##### 4x Probenpuffer:

Tris-HCl pH 6.8 (AppliChem)	240 mM
SDS-Lösung (AppliChem)	8%
Glycerin	40%
DTT	400 mM
Bromphenolblau	0,02%

##### SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer:

Tris-HCl	25 mM
Glycerin	190 mM
SDS	0,1%

**Tab. 11.** Zusammensetzung von Acrylamid-Lösungen zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen einer Größe von 5x10 cm.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>		
Acrylamid-Gehalt	4%	9%	12%	15%
Gelpuffer Tris pH 8.8 0,4% SDS	-	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
Gelpuffer Tris pH 6.8 0,8% SDS	0,625 ml	-	-	-
Acrylamid-Lsg. 30% (Roth)	0,325 ml	1,5 ml	2 ml	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	1,535 ml	2,225 ml	1,725 ml	1,225 ml
10% Ammoniumpersulfat	17,5 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Tetramethylethyldiamin	5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl

### 3.7.2. Sensitive Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Die Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte durch kurzes Aufkochen in Coomassie-Lösung und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend mit 10% Essigsäure entfärbt. Die Quantifizierung von aufgetragenem Protein wurde unter Nutzung von LowMolecularWeightMarker (LMW; GE Healthcare) als Standard und der ImageQuant TL 8.1 Software gewährleistet. 1 µl entsprechend verdünnter LMW beinhaltet die folgenden Protein-Standards in definierten Konzentrationen: 67 ng Phosphorylase B (97 kDa), 83 ng Albumin (66 kDa), 147 ng Ovalbumin (45 kDa), 83 ng Carbonanhydrase (30 kDa) und 80 ng Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa).

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	Isopropanol	25%
	Essigsäure	10%
	CoomassieBrilliantBlue G	0,05%

### 3.7.3. Immunoblot-Analyse (Western-Blot)

Sofern eine unspezifische Anfärbung aller Proteine mittels Coomassie nicht beabsichtigt war, konnten einzelne Proteine auch gezielt durch spezifische Antikörper detektiert werden. Um dies zu gewährleisten, wurden die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe einer auf eine PVDF-Membran (Roth) transferiert. Nach Äquilibration dieser in Methanol, Wasser und Transblotpuffer

wurde die Membran zusammen mit dem Proteingel und Whatman-Papieren in der Blotting-Apparatur fixiert und für 75 min bei 100V in kalten Transblottpuffer geblottet. Das Blockieren unspezifischer Proteinbindestellen geschah durch Inkubation in TBSTM über Nacht. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:10000 in TBSTM) erfolgte für 3 h. Nach drei Waschschritten in TBST (jeweils 10 min) wurde die Membran für 1,5-2 h mit dem sekundären Antikörper (1:10000 in TBSTM) inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBST und AP-Puffer für jeweils 10 min erfolgte die Entwicklung durch Zugabe von 66  $\mu$ l NBT (50 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 33  $\mu$ l BCIP (50 mg/ml in 100% Dimethylformamid) in 30 ml AP-Puffer. Die Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde durch mehrmaliges Waschen mit Wasser abgestoppt und die Membran anschließend getrocknet.

**Transblotpuffer:**

Tris pH 7.5	25 mM
Glycerin	192 mM
Ethanol	20%

**AP-Puffer:**

Tris pH 9.5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

**TBST-Puffer :**

Tris pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,05%

**TBSTM-Puffer:**

5% Magermilchpulver in TBST

### 3.7.4. Bestimmung der Genexpression mittels $\beta$ -Galaktosidase-Assay nach Miller

Durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kann die Expression eines Gens bestimmt werden, dessen stromaufwärts gelegene Regulations-Sequenzen zuvor an den *lacZ*-Leserahmen fusioniert wurden. Die Genexpression wird durch Ermittlung der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach (Miller, 1972) bestimmt und in  $\mu$ mol gespaltenes Substrat (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid; ONPG) pro Minute und mg Zellprotein angegeben. Entgegen dem Protokoll von Miller wurde die optische

---

Dichte der Zellkultur bei 578 nm gemessen. Aliquots der Bakterienkultur wurden abzentrifugiert, in geeigneten Mengen Z-Puffer aufgenommen und zum Aufschluss der Zellen mit 0,1% SDS und Chloroform versetzt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-abhängige Reaktion wurde durch Zugabe von 200  $\mu$ l ONPG (4 mg/ml in Z-Puffer) gestartet und nach Erreichen einer sichtbaren Gelbfärbung bzw. nach maximal einer Stunde durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt. Anschließend wurden die Ansätze bei 12000 rpm für 10 min zentrifugiert und die Absorption des entstandenen Produktes o-Nitrophenol bei 415 nm gemessen. Als Referenz diente ein Testansatz ohne Bakterien.

### **3.8. Protein-basierte Methoden**

#### **3.8.1. Überexpression und Aufreinigung von löslichen Proteinen**

Die Sequenzabschnitte zur Kodierung der cytoplasmatischen Domänen von PdeK und PdeD von *E. coli* K-12 W3110 wurden unter Nutzung der in Tabelle 9 angegebenen Oligonukleotide PCR-amplifiziert, die Synthese-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel aufgereinigt und mit *NcoI* und *EcoRI* verdaut. Die Konstrukte wurden mit C-terminalen Streptavidin-Tags (Strep-Tag) in die erste Multiple-Cloning-Site (MCS) von pETDUET1-Vektoren kloniert (Merck), die ebenso wie die zweite MCS der Kontrolle eines T7-abhängigen Promotors unterliegt. Die Überexpression erfolgte in *E. coli* ER2556: nach Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,5-0,8 in LB bei 37°C wurde die Expression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und die Kulturen bei 28°C für weitere 4 h inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Zellpellets wurden in 50 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 300-500 mM NaCl, 1 mM EDTA und 0.5 mM PMSF gelöst (1-2 ml pro g Pellet, mindestens 20 ml) und mittels FrenchPress (zwei Durchgänge á 18000 psi) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch 40 min Zentrifugation bei 17000 rpm (SS34 Rotor) entfernt. Der Überstand wurde mit in oben genannten Puffer äquilibrierter Streptavidin-Matrix (IBA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden am Folgetag unter Nutzung des gleichen Puffers unter Zusatz von Imidazol

(pH 8) ausgewaschen. Eine effizientere Reinigung der Proteine erfolgte unter der seriellen Nutzung von zwei Waschpuffern, die sich in ihren Imidazol-Konzentrationen (20 bzw. 40 mM) unterschieden. Die Elution erfolgte mit Streptavidin-Elutionspuffer (IBA). Zur weiteren Lagerung der Proteine bei -80°C wurden die Eluate über Nacht im 1000fachen Volumen PDE-Lagerungspuffer (25 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercapthoethanol, 5% Glycerin) dialysiert und in Aliquots gelagert. Die Quantifizierung von aufgereinigtem Protein erfolgte mittels LMW.

Zur Aufreinigung von C-terminal 6xHis-getagtem CsgD wurden der Expressionsvektor pQE60 (Quiagen; Doktorarbeit H. Weber) und der *lacIq*-Stamm *E. coli* FI1202 genutzt. Zellen mit pQE60::*csgD* wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 inkubiert und die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte nach vier Stunden Wachstum bei 28°C. Zellen wurden in TE-Puffer (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA) resuspendiert und mit 300  $\mu$ g Lysozym inkubiert und mittels FrenchPress aufgeschlossen. Inclusion Bodies und das in ihnen eingeschlossene CsgD-6xHis wurden mittels Zentrifugation von löslichen Proteinen getrennt und in 8 M Urea resuspendiert. Die Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Quiagen). Das aufgereinigte Protein wurde über Nacht gegen 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8 und 300 mM NaCl dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

Das im Enzymaktivitäts-Assay als Kontrolle verwendeten PleD\*-6xHis wurde wie bereits beschrieben überexprimiert, aufgereinigt und gelagert (Christen et al, 2005; Pesavento et al, 2008).

### 3.8.2. Überexpression und Aufreinigung von Membran-Proteinen

Die Aufreinigung von DgcC mit seinen sechs Transmembran-Domänen erfolgte ebenfalls durch Klonierung auf pETDUET1. Für die Co-Expression von *dgcC* und *pdeK* wurde *dgcC* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *KpnI* in die zweite MCS kloniert. Zur Überexpression von DgcC-Membranproteinen wurde C41 verwendet, ein BL21(DE3)-Derivat, welches sich durch erhöhte Toleranz gegenüber der Expression von toxischen Proteinen auszeichnet. Grund hierfür ist eine nicht näher

beschriebene Mutation der T7-Polymerase, mit der Folge, dass T7-abhängige Gene zwar schwächer exprimiert werden, die entsprechende mRNA jedoch auch weniger schnell wieder abgebaut wird (Miroux & Walker, 1996). Da dieser Stamm keine optimale Expression von *pdeK* zuließ, wurde zur Co-Expression von *dgcC*-6xHis und *pdeK*-Strep Rosetta(DE3) (Novagen) genutzt. Beide Stämme verfügen zusätzlich über ein pRARE2-Plasmid (Cm-Resistenz) welches für sieben zusätzliche tRNAs kodiert, die für die Expression der hier verwendeten Proteine jedoch nicht nötig sind. Die Anzucht erfolgte in TB-Medium bei 37°C. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,5-0,8 wurde die Expression mit 0,1 mM IPTG induziert und die Zellen nach 5 h Inkubation bei 37°C (DgcC-Strep) bzw. 28°C (PdeK-Strep & DgcC-6xHis) geerntet.

Das Zellpellet wurde in 50 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 300mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF und complete EDTA-free-Tabletten (Protease-Inhibitoren; Roche) (1-2 ml pro g Pellet) gelöst und die Zellen durch Frenchpress (zwei Durchgänge á 18000 psi) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden für 20 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und Zellmembranen im Anschluss durch Ultra-Zentrifugation für 1 h bei 36000 rpm (Rotor T647.5) von löslichen Proteinen getrennt. Das Membranpellet wurde in 50 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 300mM NaCl, 5% Glycerin, 2% dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM, Roth), 1 mM EDTA und 0,5 mM PMSF homogenisiert und für 2 h bei 4°C rührend inkubiert. Solubilisierter Proteine wurde von nicht-solubilisierter durch einen zweiten Ultra-Zentrifugations-Schritt getrennt und der erhaltene Überstand mit Ni-NTA-Matrix (Machery & Nagel, 6xHis-getaggte Proteine) bzw. Streptavidin-Matrix (IBA, Strep-getaggte Proteine) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht an die Matrix gebundene Proteine wurden am Folgetag mit 50 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 300 mM NaCl, 5% Glycerin, 0,05 % DDM, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF und 20 mM Imidazol ausgewaschen. Zur effizienteren Aufreinigung erfolgten auch hier weitere Waschschrte mit steigenden Mengen Imidazol (40 mM & 60 mM). An die Matrix gebundene Proteine wurden mit Streptavidin-Elutionspuffer & 0,05% DDM (Strep-Tag Proteine; IBA) bzw. Ni-NTA-Elutionspuffer (6xHis-Tag-Proteine; 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM Imidazol pH 8 und 0,05% DDM) eluiert, mit 10% Glycerin versetzt und ohne vorherige Dialyse bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung aufgereinigter Proteine erfolgte mittels LMW wie bereits beschrieben.



---

### 3.8.3. Überexpression von Gürtelproteinen (Membrane-Scaffold-Protein)

Das zur Herstellung von Lipid-Nanodiscs nötige Gürtelprotein MSP1E3D1 wurde mit N-terminalem 6xHis-Tag von pET28a (AG Schneider) in BL21(DE3) überexprimiert (Ritchie et al, 2009). Zellkulturen wurden bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,5-2,5 bei 37°C inkubiert und die MSP-Expression mit 1 mM IPTG induziert. Nach einer weiteren Stunde Wachstum bei 37°C wurden die Kulturen für drei Stunden bei 28°C inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

Das Zellpellet wurde in 20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X100, 1 mM PMSF und complete EDTA-free-Tabletten (Roche) gelöst und die Zellen durch French Press aufgeschlossen. Der Überstand mit cytoplasmatischen Proteinen wurde durch zwei Zentrifugationsschritte (10 min 15000 rpm & 30 min 36000 rpm) von Zelltrümmern und Membranbestandteilen getrennt. Die Aufreinigung erfolgte über eine Äkta Purifier bei einer Flussrate von 5 ml/min, einem Maximaldruck von 0,5 mPa und mit einer Ni-NTA-Säule mit 5 ml Volumen. Nach Beladen der Ni-NTA-Matrix wurden nicht gebundene Proteine mit jeweils fünf Säulenvolumen der folgenden Puffer auf Basis von 40 mM Tris pH 7.5 und 300 mM NaCl gewaschen: i.) 1% Triton X100 pH 8; ii.) 50 mM Cholic Acid pH 8.9; iii.) Tris-NaCl-Puffer ohne Zusätze und iv.) unter Zusatz von 25 mM Imidazol. Die Elution erfolgte durch 400 mM Imidazol in 40 mM Tris pH 7.5 und 300 mM NaCl und Fraktionen mit geeigneten Mengen 6xHis-MSP1E3D1 wurden über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 0,05% DDM und 1 mM EDTA dialysiert. Die proteolytische Abspaltung des 6xHis-Tags erfolgte mittels TEV-Protease, war jedoch nicht Teil dieser Arbeit. Aufgereinigtes und vom 6xHis-Tag getrenntes MSP1E3D1 wurde für diese Arbeit in Kooperation mit der AG Schneider hergestellt.

### 3.8.4. Inkorporation von Membran-Proteinen in Nanodiscs

Der Einbau von Transmembran-Proteinen in Nanodiscs erfolgte im Wesentlichen wie bei (Ritchie et al, 2009) und (Heuveling et al, 2014) beschrieben unter Nutzung von *E. coli*-Lipiden (*E. coli* polar lipids, Avanti; *E. coli* B ATCC 11303 gewachsen in Kornberg MinimalMedium bei 37°C; Probenahme nach etwa  $\frac{3}{4}$  der log Phase;

Zusammensetzung: 57,5% PE, 15,1% PG, 9,8% CA, 17,6% unbekannt) und des Gürtelproteins MSP1E3D1, einem Derivat von MSP1, welches die Herstellung von Discs mit einem Durchmesser von 12,1 nm ermöglicht (Ritchie et al, 2009). Entsprechende Mengen Lipids wurden im Rotationsverdampfer getrocknet, mit ND-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl) und 1% DDM versetzt und durch 5-10 min Inkubation im Ultraschallbad gelöst. Für 25 mg Lipid (1 ml gelöst in Chloroform) wurden hier 2,7 ml Puffer und 261 µl 10% DDM genutzt. Zum Einbau von 0,8 mg Strep-getaggten DgcC wurden 987 µl dieser Lipidlösung zusammen mit 1,62 mg MSP1E3D1 genutzt, was einem molaren Verhältnis von 2 : 7 (DgcC : MSP) entspricht. Die Ansätze wurden in Glasröhrchen rollend für 1 h bei 4°C inkubiert und im Anschluss zum Entfernen des Detergenz mit in ND-Puffer äquilibrierten BioBeads (Biorad) versetzt (1,5 g pro 5 ml Ansatz). Da das im Membran-Protein-Puffer enthaltene Glycerin den Aufbau von Nanodiscs behindern kann, wurden die Ansätze mit ND-Puffer bis zu einer Glycerin-Konzentration von unter 3% verdünnt. Um Oxidation der Lipide zu verhindern, wurden die Ansätze bis zu diesem Punkt nach jedem Arbeitsschritt mit N<sub>2</sub> überschichtet und die Röhrchen mit Parafilm verschlossen. Nach vier weiteren Stunden Inkubation bei 4°C wurde der Überstand mit den enthaltenen Nanodiscs abgenommen und mit Strep-Tactin-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Suspension mit ND-Puffer versetzt mit 20 & 40 mM Imidazol gewaschen und mit Strep-Tactin-spezifischen Elutionspuffer (IBA) eluiert. Die Eluate mit DgcC-Strep in Nanodiscs konnten für wenige Tage in DGC-Assays genutzt werden. Eine Quantifizierung von DgcC-Strep und MSP erfolgte mittels SDS-Page und LMW als Standard. Davon ausgehend, dass eine Disc durch zwei MSP-Moleküle stabilisiert wird, kann eine Quantifizierung von DgcC-Strep und MSP in Molar einen Hinweis auf das Vorhandensein von Monomeren oder Dimeren in den Discs geben.

### **3.8.5. Nachweis enzymatischer Aktivität von DGCs/ PDEs nach Christen et al.**

Die Fähigkeit potentieller Diguanylatzyklasen und Phosphodiesterasen, P<sup>33</sup>-GTP bzw. P<sup>33</sup>-c-di-GMP umzusetzen, wurde in 20 µl Ansätzen mit 1-10 µM löslichem Protein oder

in Nanodiscs eingebauten Membranproteinen in entsprechendem Reaktionspuffer durchgeführt. Nach Zugabe des Substrates (0,185 mBq  $P^{33}$ -c-di-GMP bzw.  $P^{33}$ -GTP = 82,5 nM; Hartmann Analytik) wurden die Ansätze bei 30°C inkubiert und nach 10-90 min 5 µl Proben genommen und mit 5 µl EDTA (0,5 M) versetzt. Sofern angegeben wurde zusätzlich zu radioaktiv markiertem Substrat auch nicht markiertes zum Ansatz gegeben. Die Auftrennung von Substraten und Syntheseprodukten mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC-Platte: Polygram Cel300 PEI; Machery-Nagel) unter Verwendung von gesättigtem  $NH_4SO_4$  und 1,5 M  $KH_2PO_4$  (2:3 v/v) als Laufmittel. Die Visualisierung von  $P^{33}$ -c-di-GMP bzw.  $P^{33}$ -GTP erfolgte mittels Phosphorimaging. Die Intensität aufgetrennter Radionukleotid-Spezies wurde durch Quantifizierung der entsprechenden Signale mit ImageQuant TL ArrayAnalysis V8.1 berechnet und die  $K_d$  unter Nutzung von Prism6.0g (Trial) ermittelt (Parameter: nonlinear regression & Saturation Binding equations: one site specific binding).

**PDE-Reaktionspuffer für PdeK und PdeD:** (Lagerungspuffer Kapitel 3.8.1)

Tris pH 8	25 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
β-Mercaphtoethanol	5 mM
Glycerin	5%

**DGC-Reaktionspuffer für DgcC in Nanodiscs:**

Tris pH 7.5	25 mM
NaCl	100 mM
β-Mercaphtoethanol	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> bzw. MnCl <sub>2</sub>	5 mM

---

### 3.8.6. Bacterial-Two-Hybrid-Assay zur Untersuchung von Protein-Protein- Interaktionen *in vivo* nach Karimova et al.

Die Interaktion von Proteinen wurde mit Hilfe eines Bacterial-Two-Hybrid Systems nach (Karimova et al, 1998) untersucht. Dieser Versuchs-Aufbau basiert auf die Wiederherstellung des cAMP-abhängigen Signalweges, der unter anderem der Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen dient. Als Vektoren wurden die Plasmide pKT25 und pUT18/pUT18C genutzt, die jeweils eine Untereinheit der Adenylatzyklase des Betaproteobakteriums *Bordatella pertussins* kodieren. Die Klonierung entsprechender DNA-Sequenzen in diese Vektoren führte zu Fusionsproteinen aus T25 bzw. T18 und entsprechendem Test-Protein. Die co-Transformation erfolgte in *cyaA*-negative *E. coli* K-12 Stämme, die kein cAMP *de novo* synthetisieren. Sofern die zu testenden Proteine interagierten, konnten dies auch die Adenylatzyklase-Untereinheiten T25 und T18 und es kam zur Bildung von cAMP, welches an den Transkriptionsregulator CRP binden konnte und den Abbau alternativer Kohlenstoffquellen wie Lactose und Maltose gewährleistete. Bei Verwendung von MacConkey-Indikatorplatten können Zellen mit interagierenden Proteinpartnern die im Medium enthaltenen Kohlenstoffquellen fermentativ abbauen und die Umgebung ansäuern. Neutralrot als pH-Indikator im Medium färbt entsprechende Kolonien rot. Als interne Positiv-Kontrolle dient die Kombination von pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*, die für Fusionsproteine aus T25- bzw. T18-Fragment und einem 35 AS langen Leucin-Zipper des *Saccharomyces*-Transkriptionsregulators GCN4 kodieren. Die Leucin-Zipper-Domänen formen Dimere und gewährleisten die Interaktion der angehängten Fusionsproteine (Blondel & Bedouelle, 1991). Negativ-Kontrollen stellten die entsprechenden Plasmide ohne Insert dar. Transformanten mit beiden Plasmiden wurden in 0,9% NaCl suspendiert und 3-5 µl der Suspension auf MacConkey-Platten mit 1% Maltose, Ampicillin und Kanamycin getropft. Nach Inkubation für 20-24 h bei 28 °C erfolgte die Auswertung der Ergebnisse.

---

### 3.9. Datenbanken und bioinformatische Analysen

Für Angaben zu Gen- und Protein-Sequenzen und deren Analyse wurden folgende Datenbanken genutzt:

- NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))
- EcoCyc *E. coli* database ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org))
- UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))
- ExPASy bioinformatics Resource Portal ([www.expasy.org](http://www.expasy.org))
- CBS prediction Server ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk))
- PFAM protein family database ([www.pfam.xfam.org](http://www.pfam.xfam.org))



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Etablierung eines Cellulose-produzierenden *E. coli* K-12 zur Untersuchung der Biofilmbildung

Fokus dieser Arbeit war die c-di-GMP-regulierte Synthese extrazellulärer Matrixsubstanzen in *E. coli*-Biofilmen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf amyloide Curli Fimbrien und Cellulose gelegt, die in der stationären Wachstumsphase RpoS- und CsgD-abhängig exprimiert werden. Parallel zur Synthese einer Biofilm-Matrix wird in dieser Phase die flagellare Genexpression reprimiert (Barembuch & Hengge, 2007; Pesavento et al, 2008; Pesavento & Hengge, 2012). Die Expression amyloider Curli Fimbrien in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor MlrA und dessen Regulation durch c-di-GMP-assoziierte Enzyme ist bereits gut beschrieben (Hammar et al, 1995; Lindenberg et al, 2013; Pesavento et al, 2008; Weber et al, 2006). Aufgabe dieser Doktorarbeit war es nun, die Cellulose-Synthese in dieses Regulationsnetzwerk einzuordnen und den Mechanismus der Kontrolle durch c-di-GMP auf molekularer Ebene aufzuklären.

#### 4.1.1. Trotz hoch-konservierten *bcs*-Lokus synthetisiert *E. coli* K-12 keine Cellulose

Die c-di-GMP-abhängige Signaltransduktion und die damit verbundene Synthese von Curli Fimbrien sind in *E. coli* bereits gut verstanden. An Forschungen zur molekularen Regulation der Cellulose-Synthese mangelt es jedoch, da die weit verbreiteten und gut beschriebenen Laborstämme der *E. coli* K-12-Linien nur Curli Fimbrien produzieren, nicht aber Cellulose (Da Re & Ghigo, 2006; Zogaj et al, 2001).

Der *bcs*-Lokus ist in Cellulose-produzierenden *Enterobacteriaceae* hoch konserviert und die zur Cellulose-Synthese essentiellen Gene sind in *E. coli* und verwandten Spezies in zwei divergenten Operonen kodiert, *yhjR-bcsQABZC* und *bcsEFG* (Römling et al, 2007). DNA-Sequenzvergleiche zwischen dem Cellulose-produzierenden Stamm *E. coli* EAEC 55989 und dem K-12-Stamm W3110 ergaben im Bereich des *bcs*-Lokus 97 Abweichungen auf DNA-Ebene, wovon 19 auch zu Änderungen in der Aminosäure-

Die *bcsQ*-Mutation begleitet vom Cellulose-negativen Phänotyp war auch in anderen sequenzierten K-12-Stämmen wie MG1655, DHB10 oder MC4100 zu finden, nicht aber in unabhängig isolierten Linien wie Nissle 1917 oder nahen Verwandten wie *Shigella flexneri*, was für eine zeitig aufgetretene Mutation im Verlauf der Etablierung unterschiedlicher K-12-Linien spricht. Vertreter der zweiten Linie gängiger *E. coli*-Laborstämmen, sogenannte B-Stämme (Bsp. BL21 und dessen Derivate C41 & C41),



---

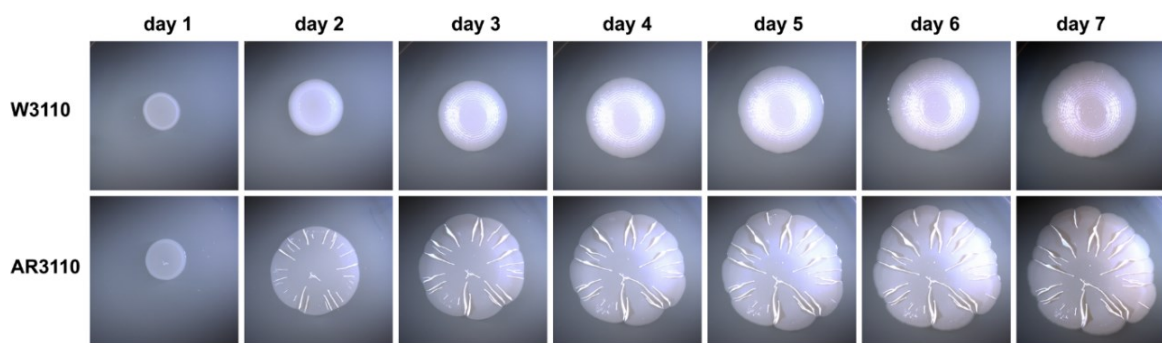
konnten Cellulose als Matrixsubstanz unter bestimmten Kulturbedingungen synthetisieren, zeigen aber eine abweichende Regulation dieser (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2. Die Wiederherstellung der Cellulose-Synthese in *E. coli* K-12

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche der von der 55989-Sequenz abweichenden Nukleotide für den Verlust der Cellulose-Synthese in *E. coli* K-12 verantwortlich sind. Trotz zahlreicher Nukleotid-Unterschiede im *bcs*-Lokus rückte die oben beschriebene *bcsQ*-Mutation in den Fokus des Interesses und wurde mittels zweischritt-Mutagenese an die Sequenz des Cellulose-produzierenden EAEC 55989 angeglichen (TAG→ TTG). Als Resultat dessen ging daraus der *E. coli* K-12 Stamm AR3110 hervor, der im weiteren Verlauf auf seine Biofilmeigenschaften hin untersucht und mit dem Ausgangsstamm W3110 verglichen werden konnte.

Die Synthese von Curli-Fimbrien wird durch niedrige Osmolarität des Mediums stimuliert (Prigent-Combaret et al, 2001), weshalb für die Anzucht von Makrokolonien wenn nicht anders angegeben LB ohne NaCl (im Folgenden LBnoS) genutzt wurde. Abbildung 5 zeigt die K-12 Stämme W3110 und AR3110 bei der Entwicklung von Makrokolonie-Biofilmen auf LBnoS-Agar-Medium über einen Zeitraum von sieben Tagen. Ausgehend von vergleichbaren Zellzahlen zu Beginn des Experimentes zeigten beide Linien ab dem zweiten Tag der Inkubation stark unterschiedliche Phänotypen. Während W3110 ein gleichmäßiges Muster konzentrischer Ringe entwickelte, bildeten AR3110-Kolonien eine weitaus ungeordnetere Oberflächenstruktur mit radial verlaufenden Stegen und flachen Bereichen zwischen diesen aus.

Alle Bilder wurden über den gesamten Zeitraum hinweg mit gleichbleibender Vergrößerung aufgenommen wurden. Gut erkennbar ist damit der größere Koloniedurchmesser des Cellulose-produzierenden AR3110. Dieser Unterschied ist nicht auf schnelleres Wachstum und einen damit einhergehenden rascheren Anstieg der Zellzahl zu begründen. Vielmehr bildet der Cellulose-positive AR3110 deutlich flachere Kolonien aus, als der Ausgangsstamm W3110 [60 µm im Vergleich zu 200 µm; (Serra et al, 2013a)].

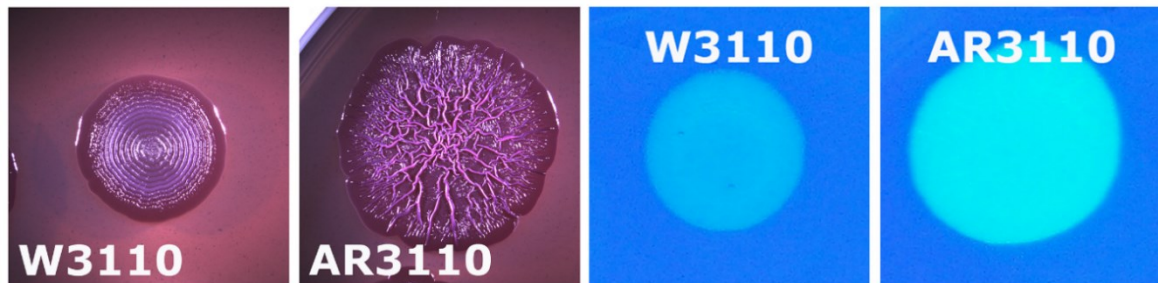


**Abb. 5. Zeitlicher Verlauf der Makrokolonie-Entwicklung von W3110 und AR3110.** 5 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* K-12 W3110 bzw. AR3110 wurden auf LBnoS bei 28°C inkubiert und die Entwicklung der Kolonien und ihrer Oberflächenstrukturen täglich dokumentiert.

Als Indikatoren für den Nachweis von extrazellulären Matrixsubstanzen haben sich Congo-Rot und Calcofluor als Medienzusätze etabliert und wurden im Folgenden zur genaueren Untersuchung der Makrokolonien genutzt. Congo-Rot bindet sowohl extrazelluläre Proteine als auch Polysaccharide, wird in den Kolonien eingelagert und färbt sie rot (Hammar et al, 1995). Calcofluor hingegen dient dem spezifischeren Nachweis von Polysacchariden wie Cellulose, indem es freie Hydroxylgruppen der Fibrillen bindet (Benziman et al, 1980). Die Akkumulation des Farbstoffs in den Kolonien kann mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Obwohl Cellulose und Curli Fimbrien chemisch verschieden sind, binden auch letztere Calcofluor, wenn auch in geringerer Intensität im Vergleich zu Cellulose. Eine Unterscheidung in Cellulose-negativen bzw. -positiven Phänotypen war unter Nutzung entsprechender Kontroll-Stämme dennoch möglich.

Bei Inkubation auf Congo-Rot-haltigem Medium zeigten W3110 und AR3110 intensive Rotfärbung, die auf die Produktion extrazellulärer Matrixsubstanzen hindeutete. Die bereits beschriebene Koloniemorphologie war nach Zugabe von Congo-Rot-Lösung (in 70% Ethanol; im Medium 1,4% EtOH) im Medium stärker ausgeprägt als bei Wachstum auf LBnoS ohne Zusätze, da Ethanol die Synthese von Matrixsubstanzen und damit die Bildung komplexer Oberflächenstrukturen zusätzlich stimuliert (Gerstel & Römling, 2001). Nach Inkubation auf Calcofluor-haltigem Medium konnte die Farbstoffeinlagerung bei *E. coli* K-12 AR3110 gut detektiert werden, während W3110

nur schwach fluoreszierte. AR3110 synthetisiert und sekretiert dementsprechend Cellulose, W3110 hingegen nicht.



**Abb. 6. Das *E. coli* K-12 W3110-Derivat AR3110 bildet Cellulose.** 5 µl einer Übernachtskultur wurden auf LBnoS mit Congo-Rot für fünf Tage bei 28°C inkubiert (links). Zur Sichtbarmachung von Cellulose wurden Makrokolonien auf LBnoS mit Calcofluor für zwei Tage bei 28°C inkubiert (rechts). Gebildete Matrixsubstanzen akkumulierten die Farbstoffe in den Makrokolonien. Calcofluor-bindende Kolonien erschienen unter UV-Licht heller.

Durch Angleichung der *bcsQ*-Mutation im W3110 wurde ein *E. coli* K-12-Stamm generiert, der sich durch verstärkte Exopolysaccharid-Synthese in Form von Cellulose und veränderte Makrokolonie-Eigenschaften auszeichnet.

#### 4.1.3. Die *bcsQ*-Punktmutation unterbindet die Transkription von *bcsQABZC*

Für die Vorhersage offener Leserahmen in sequenzierten Genomen werden oftmals nur Promotor-Region und Shine-Dalgarno-Sequenz in Kombination mit (alternativen) Start- und Stop-Codon genutzt. Erst eine genauere Betrachtung der Nukleotid-Sequenz von 55989 und W3110 ließ jedoch vermuten, dass das ATG-Codon den eigentlichen *bcsQ*-Translations-Start darstellt und das Vorhandensein eines alternativen GTG-Starts im W3110 zur fehlerhaften Annotation von *bcsQ* in diesem und anderen K-12-Stämmen führte. Sofern das ATG-Codon auch in K-12 den Translationsstart darstellt, würde die TTG→TAG-Mutation zum Translationsabbruch führen. BcsQ ist essentiell für die Cellulose-Synthese und eine fehlende oder nur schwache Gen-Expression kann Grund für den Cellulose-negativen Phänotypen von *E. coli* K-12 sein (Le Quere & Ghigo, 2009).

---

Alternative Start-Codons dienen auch in anderen Genen wie *lacI* und *lacA* als Translationsstart und sind demnach kein alleiniges Indiz für unzureichende Translation. Erst eine genauere Betrachtung der Genexpression kann Aufschluss geben ob i.) die stromaufwärts liegenden Promotor-Sequenzen die Expression von *yhjR-bcsQABZC* erlauben; ii.) *bcsQ* trotz alternativen Start-Codons exprimiert wird und iii.) ob die *bcsQ*-Mutation polar auf nachfolgende Gene wirkt.

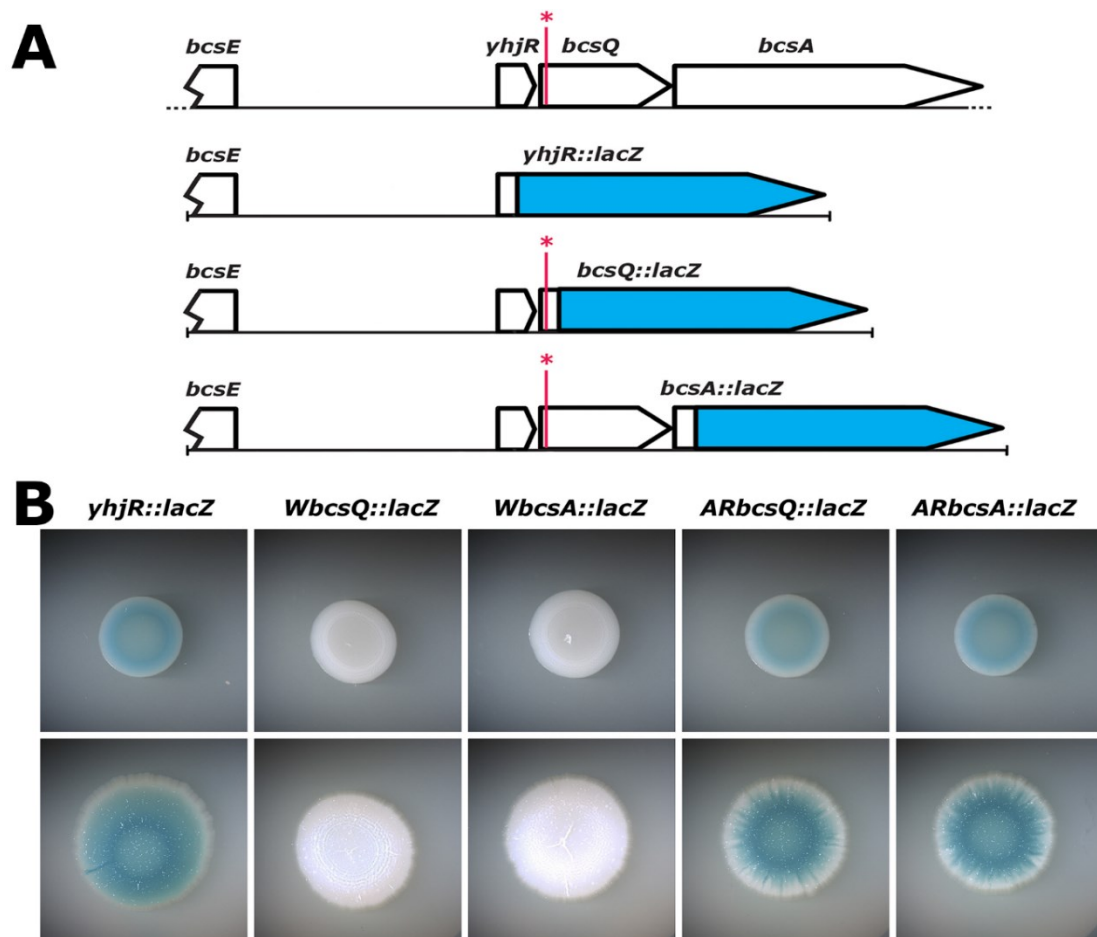
Zu diesem Zweck wurden *lacZ*-Reportergenfusionen konstruiert und in das bakterielle Genom integriert, die den Promotorbereich und die ersten Basentriplets des zu untersuchenden Genes zusammen mit dem *lacZ*-Leseraster trugen, welches für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, und in das Chromosomen von *lacZ*-Deletionsstämmen integriert (vgl. Kapitel 3.6.13). Da die Reportergenfusion den einzigen *lacZ*-Leserahmen im Genom darstellt, lässt die gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität Schlussfolgerungen über die Expression der Reportergenfusion zu.

Abbildung 7A gibt einen Überblick über den Aufbau dieser Fusionen, *yhjR::lacZ*, *bcsQ::lacZ* und *bcsA::lacZ* und die Lage des *bcsQ*-Basenaustauschs. Alle drei Fusionen beinhalten die intergenetische Region zwischen beiden *bcs*-Operonen sowie das 5'-Ende von *bcsE* (406 Basenpaare vor *yhjR*-Start). *WbcsQ::lacZ* und *WbcsA::lacZ* wurden unter Verwendung der W3110-Sequenz als DNA-Template hergestellt und tragen demnach die TAG-Stop-Mutation, während *ARbcsQ::lacZ* und *ARbcsA::lacZ* an dieser Stelle wie EAEC 55989 für Leucin (TTG) kodieren.

Die aus der AR3110-Sequenz generierten Fusionen (*ARbcsQ::lacZ* und *ARbcsA::lacZ*) zeigten in Flüssigkultur bzw. auf Festmedium vergleichbar schwache, aber messbare Genaktivität und bildeten in der Kolonie nach 5 Tagen Inkubation ähnliche strahlenförmige Expressionsmuster aus (Abb. 7B & 8). Beides spricht dafür, dass die Expression von *bcsQ* und *bcsA* co-reguliert wird, worauf ihre Lage in einem Operon bereits hindeutet. Zusätzlich kann auch davon ausgegangen werden, dass sich im *bcsQ*-Leserahmen keine weiteren internen Promotoren oder zusätzliche Bindungssequenzen für Regulatoren befinden, die die Expression stromabwärts liegender Gene zusätzlich modulierten. Auch *yhjR* ist Teil dieses Operons, wurde aber stärker exprimiert und zeigte eine flächige Expression bei Wachstum auf Festmedium. Grund hierfür können post-transkriptionale Regulationsmechanismen sein. Die Fusionen auf Basis der

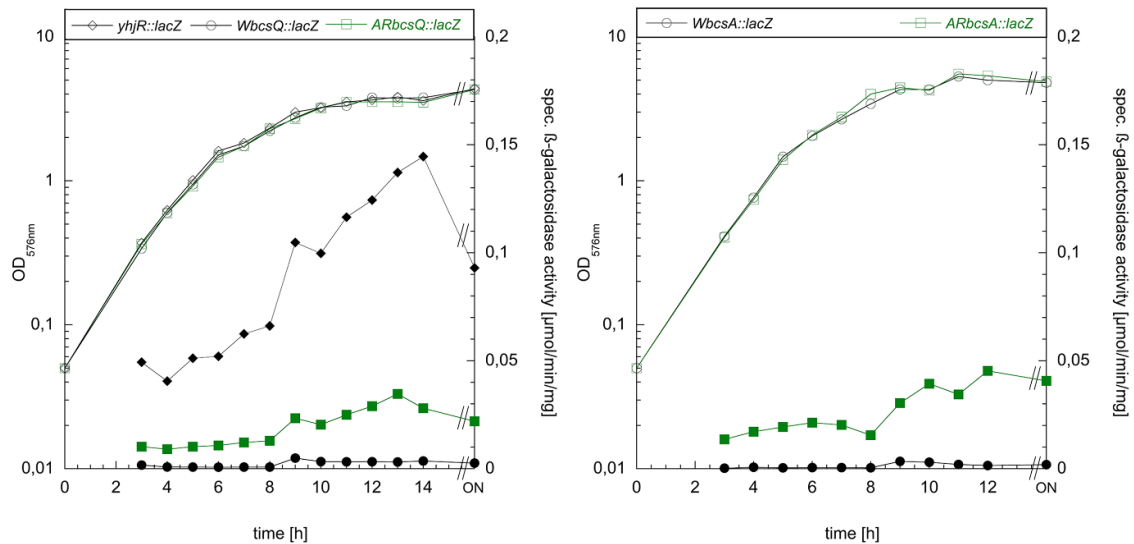
W3110-Sequenz (*WbcsQ::lacZ* und *WbcsA::lacZ*) wurden weder in Flüssigkultur noch auf Festmedium exprimiert.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass i.) entsprechende Promotorsequenzen in *E. coli* K-12 die Expression des *yhjR-bcsQABZC*-Operons gewährleisten (*yhjR::lacZ*); ii.) das alternative GTG-Start-Codon im W3110 jedoch nur zu kryptischer *bcsQ*-Expression ausreicht (*bcsQ::lacZ*) und iii.) die TTG→TAG-Mutation in *E. coli* K-12 zusätzlich polar auf nachfolgende Gene wirkt und die Expression dieser unterbindet (*bcsA::lacZ*).



**Abb. 7. Konstruktion von *yhjR*-, *bcsQ*- und *bcsA*::*lacZ*-Reporter-Genfusionen und ihre Expression auf Festmedium.** A) Interregionale Region beider *bcs*-Operone und 5'-Region des *yhjR-bcsQABZC*-Operons und die hergestellten Reporter-Genfusionen *yhjR::lacZ*, *bcsQ::lacZ* und *bcsA::lacZ*. Blau dargestellt ist der *lacZ*-Leserahmen. Die Lage der *bcsQ*-Mutation ist rot hervorgehoben. Länge der intergenetischen Region und der Gene sind nicht maßstabsgetreu. B) Expression der Reporter-Genfusionen auf LBnoS mit X-Gal nach zwei (oben) und sechs Tagen (unten). *WbcsQ::lacZ* und *WbcsA::lacZ* tragen die W3110-spezifische *bcsQ*-Mutation (TAG), *ARbcsQ::lacZ* und *ARbcsA::lacZ*

das an die 55989-Sequenz angepasste TTG-Triplet. Die Expression von *lacZ* und damit einhergehender  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität führte zur Umsetzung von X-Gal in Galaktosidase und 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Letzteres wird durch Sauerstoff zu blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert.

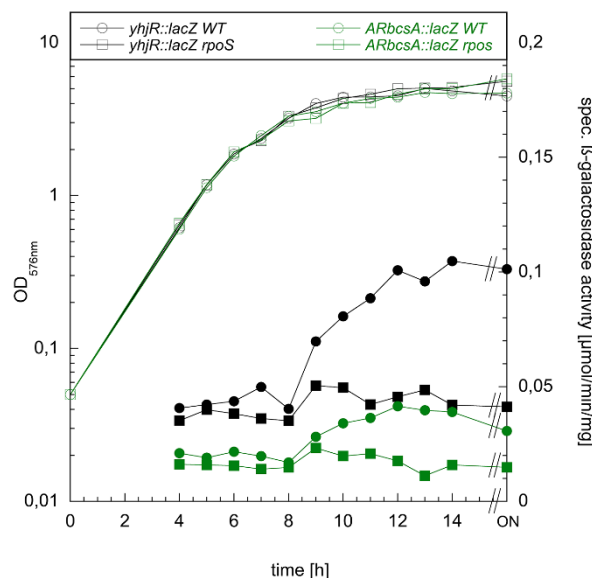


**Abb. 8.** Expression der *lacZ*-Reporterfusionen von *yhjR*, *bcsQ* und *bcsA* in Flüssigkultur entlang der Wachstumskurve bei 28°C. *WbcsQ::lacZ* und *WbcsA::lacZ* (schwarz) tragen die W3110-spezifische *bcsQ*-Mutation (TAG), *ARbcsQ::lacZ* und *ARbcsA::lacZ* (grün) das an die 55989-Sequenz angepasste TTG-Triplet. Offene Symbole markieren die OD<sub>578</sub>, geschlossene Symbole die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. ON Übernachtwert nach 28 h Wachstum. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

#### 4.1.4. Die Expression des Cellulose-Komplexes ist RpoS-aktiviert

Die unter 4.1.3. untersuchten Reporterfusionen wurden bereits in der exponentiellen Wachstumsphase schwach exprimiert. Ein Anstieg der Genexpression mit Eintritt in die post-exponentielle Wachstumsphase ließ jedoch zusätzlich zur schwachen Basalexpression auch eine RpoS-abhängige Expression vermuten (vgl. Abb. 8). Microarray-Analysen identifizieren unter anderem *bcsA*, zu diesem Zeitpunkt noch unter *yhjP* annotiert, als Bestandteil des RpoS-Regulons, welches bei OD<sub>578</sub> 4, unter osmotischem Stress und bei einem pH von 5 verstärkt exprimiert wird (Weber et al, 2005). Auch die negative Kontrolle von *yhjR* durch FliZ unterstützt die Hypothese eine

Stationär-Phasen-induzierten Expression (Pesavento et al, 2008). Eine Verifizierung dieser Daten durch Untersuchungen von Reporterfusionen fehlte jedoch bisher. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde die Expression der *yhjR*- und *bcsA::lacZ*-Fusionen in *rpoS*-Deletionsmutanten untersucht und mit dem Wildtyp verglichen (Abb. 9). Beide Fusionen verzeichneten einen Anstieg der Expression ab einer OD<sub>578</sub> von etwa 2,5-3 in LB, was dem Übergang der post-exponentiellen zur stationären Phase entsprach und nur im Wildtyp-Hintergrund, nicht aber in den *rpoS*-Mutanten, zu beobachten war. Der Sigmafaktor der generellen Stressantwort, RpoS, aktiviert demnach die Expression des Cellulose-Operons und verstärkt die Transkription der Komponenten der Cellulose-Synthese-Maschinerie mit Eintritt in die Stationärphase.



**Abb. 9. *yhjR::lacZ*- und *bcsA::lacZ*-Expression in Abhängigkeit von *rpoS*.** Verlauf der Reporterexpression entlang der Wachstumskurve in LB-Medium bei 28°C im Wildtyp-Hintergrund (WT) und in Abwesenheit von RpoS (*rpoS::cm*). Offene Symbole markieren die OD<sub>578</sub>, geschlossene Symbole die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität. ON Übernachtwert nach 28 h Wachstum. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

---

## **4.2. Makrokolonie-Biofilme als Indikator für die Synthese von Matrixsubstanzen**

Während im Labor Studien zur bakteriellen Physiologie und Genetik meist in Flüssigkulturen vorgenommen werden, sind Bakterien in der Natur oftmals in Biofilmen organisiert. Als Modellsystem für deren Untersuchung wurden im Verlauf dieser Arbeit Makrokolonien auf Agar-Platten genutzt, die aus wenigen Mikrolitern eine Stationärphasen-Kultur hervorgingen und über mehrere Tage inkubiert wurden. Zur Entwicklung und Reifung dieser Biofilme trugen c-di-GMP-regulierte Matrixbestandteile wie Curli Fimbrien und Cellulose maßgeblich bei.

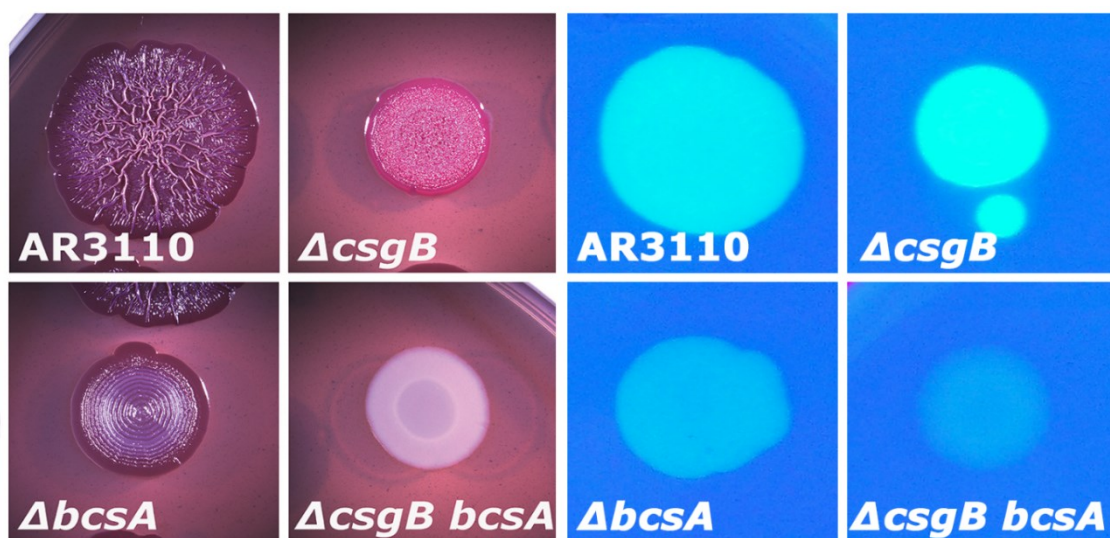
### **4.2.1. Curli Fimbrien und Cellulose formen die Struktur von Makrokolonien**

Als Indikator für die Synthese von amyloiden Curli Fimbrien und Cellulose können Congo-Rot oder Calcofluor dienen, die an extrazelluläre Strukturen binden und die Makrokolonien anfärben. Neben dem Vorhandensein von Curli und Cellulose bestimmen auch deren Verhältnis zueinander und ihr Vorkommen in unterschiedlichen Schichten der Kolonie die Eigenschaften von *E. coli* Biofilmen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde dementsprechend nicht nur auf die Anfärbung mit Congo-Rot besonderes Augenmerk gelegt. Vielmehr wurden charakteristische Oberflächenstrukturen beschrieben, wie sie durch das Zusammenspiel von Curli, Cellulose und Flagellen entstehen.

Die Ausbildung solcher Strukturen in Abhängigkeit von Matrixsubstanzen konnte durch Inkubation von AR3110-Derivaten auf CR- und CF-Platten gezeigt werden (Abb. 10). Stämme, die Curli Fimbrien und Cellulose synthetisieren, bildeten flache Kolonien mit Stegen aus, die vom Koloniezentrum radial nach außen verlaufen und Höhen von bis zu 5 mm erreichen konnten (AR3110). Durch Deletion der Cellulose-Synthase *bcsA* konnten Kolonien erzeugt werden, die konzentrische Ringe auf der Oberfläche ausbildeten, wie sie bereits für W3110 beschrieben wurden. Sofern Cellulose als einziger Matrixbestandteil synthetisiert wurde (Deletion der Curli-Untereinheit  $\Delta csgB$ ), erschienen die Kolonien kleiner, waren pink angefärbt und zeichneten sich durch



schmale, ineinander verzweigte Fältchen aus. Kolonien einer  $\Delta csgB \Delta bcsA$ -Mutante, die weder Curli noch Cellulose bildeten, banden kein Congo-Rot und hatten statt komplexer Strukturen eine glatte, glänzend erscheinende Oberfläche. Analog zur Cellulose-Synthese ließen sich AR3110 und die  $\Delta csgB$ -Mutante mit Calcofluor anfärben und erschienen unter UV-Licht heller (Abb. 10 rechter Bildteil). Auch Curli Fimbrien binden Spuren von Calcofluor, was die leichte Anfärbung der  $\Delta bcsA$  Mutante erklärt, die in der Curli-Cellulose-Doppelmutante nicht zu beobachten war.



**Abb. 10.** Das Zusammenspiel von Curli und Cellulose bestimmt die Struktur von Makrokolonien. 5  $\mu$ l einer Übernachtskultur von *E. coli* K-12 AR3110 und seiner Derivate wurden auf LBnoS mit Congo-Rot für fünf Tage bei 28°C inkubiert (links) bzw. auf LBnoS mit Calcofluor für zwei Tage inkubiert (rechts). Calcofluor-bindende Kolonien erscheinen unter UV-Licht heller.

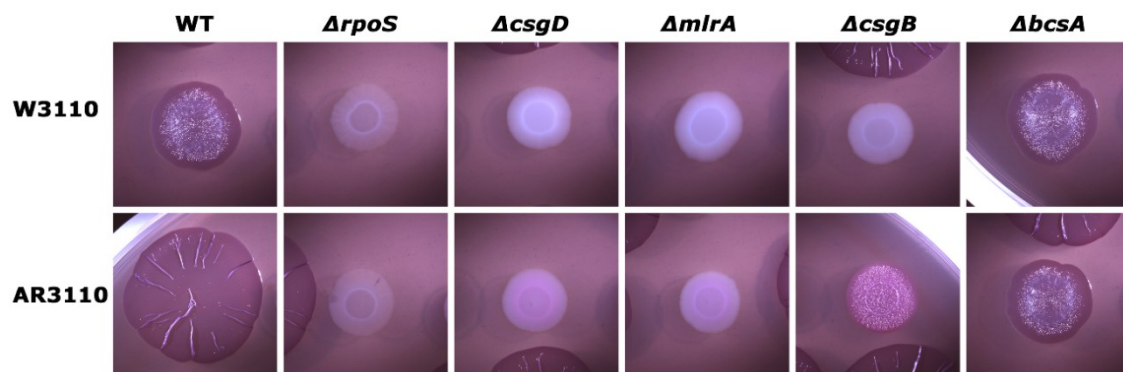
#### 4.2.2. Globale Biofilm-Regulatoren und deren Einfluss auf die Synthese von Matrix-Bestandteilen

Die Produktion von Matrixsubstanzen wird in *E. coli* durch ein komplexes Zusammenspiel aus Sigma-Faktoren, Transkriptions-Regulatoren, kleinen RNAs und intrazellulären Signalmolekülen reguliert. So ist die Synthese von Curli und Cellulose in *E. coli* K-12 abhängig von den Transkriptionsfaktoren CsgD und MlrA und dem Sigmafaktor der generellen Stressantwort, RpoS (vgl. Abb. 2 & 9).

Die Deletion einer dieser drei Komponenten beeinflusst dementsprechend die Synthese von Curli und Cellulose negativ ähnlich der  $\Delta csgB \Delta bcsA$ -Mutante in

Abbildung 10. Sowohl im W3110-Hintergrund als auch im AR3110 bildeten sich nach Deletion von *csgD* bzw. *mlrA* weder Oberflächenstrukturen aus noch färbten sich die Kolonien stark an (Abb. 11). Die schwache Congo-Rot-Bindung der *mlrA*- und *csgD*-Deletionsmutanten im AR3110 lässt zusätzlich auf eine CsgD-unabhängige Cellulose-Synthese schließen, deren Einfluss unter den getesteten Bedingungen jedoch gering ausfiel. In beiden K-12 Stämmen nahm die *rpoS*-Mutante eine leicht bräunliche Farbe an. Da Curli Fimbrien und Cellulose als Teil der RpoS-abhängigen Genexpression hier nicht gebildet wurden, ist das Vorhandensein einer weiteren Matrixkomponente wie PGA wahrscheinlich. Die verwendeten  $\Delta csgB$ - und  $\Delta bcsA$ -Mutanten bestätigten, dass W3110 nur Curli, AR3110 jedoch Curli und Cellulose bildet.

RpoS, CsgD und MlrA kontrollieren demnach durch Regulation der Congo-Rot-bindenden Matrixsubstanzen Curli und Cellulose die Ausbildung komplexer Makrokolonie-Strukturen in *E. coli*-Biofilmen.



**Abb. 11. RpoS, MlrA und CsgD regulieren die Synthese von Curli Fimbrien und Cellulose.** 5  $\mu$ l einer Übernachtskultur von W3110- bzw. AR3110 und Deletionsmutanten des Sigma-Faktors der generellen Stressantwort RpoS, des Biofilm-Regulators CsgD und des Transkriptionsregulators MlrA wurden auf LBnoS mit Congo-Rot für fünf Tage bei 28°C inkubiert. Als Referenzen dienen Deletionsmutanten der Curli-Untereinheit CsgB und der Cellulose-Synthase BcsA.

#### 4.2.3. Flagellen als Bestandteil der Makrokolonie

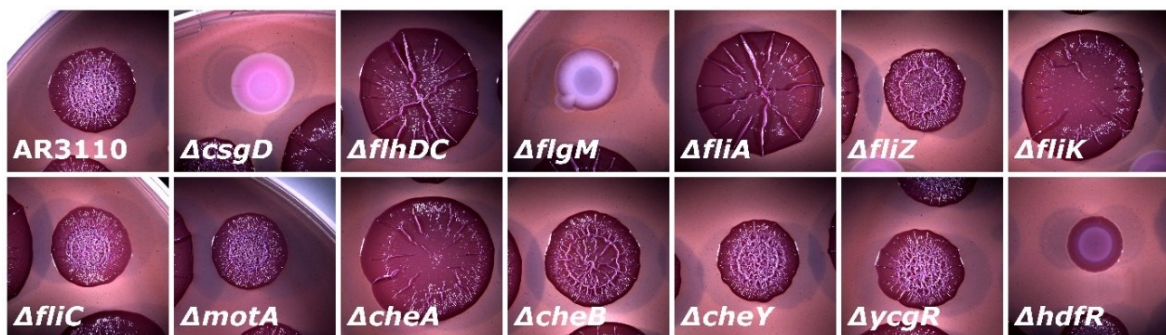
Curli Fimbrien und Cellulose unterliegen der RpoS-abhängigen Genexpression und werden in *E. coli* verstärkt in der stationären Wachstumsphase exprimiert. Mit Eintritt in diese Phase wird darüber hinaus die Expression der zur Flagellen-Synthese

benötigten Gene reprimiert (Barembuch & Hengge, 2007; Pesavento et al, 2008; Pesavento & Hengge, 2012). Physiologisch betrachtet wird das stationäre Wachstum unter anderem durch mangelndes Nährstoffangebot des umgebenden Mediums stimuliert (Hengge, 2011). Wachstumsbedingungen wie das Vorhandensein von Mikro- und Makro-Nährstoffen, Sauerstoff und Wasser oder pH-Werte sind für den gesamten Biofilm jedoch nicht gleich verteilt, sondern liegen als Gradienten vor. So gewährleistet das Wachstum auf komplexen, nährstoffreichen LB-Agar für die unteren Zellschichten einer Makrokolonie eine bessere Nährstoffversorgung, als für die oberen Bereiche. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen kann belegt werden, dass Flagellen in der dem Agar aufliegenden Schicht einer Makrokolonie und dem Randbereich vorhanden sind (Serra et al, 2013b)(vgl Kapitel 1.1.1). Inwieweit bestimmen Komponenten der flagellaren Gen-Kaskade jedoch die Morphologie des Biofilms?

Abbildung 12 zeigt Makrokolonien verschiedener Deletionsmutanten der flagellaren Genkaskade im *E. coli* K-12 AR3110-Hintergrund. Stämme mit Mutationen in den Genen  $\Delta flhDC$  (Transkriptionsregulator),  $\Delta fliA$  (Sigmafaktor der Flagellen-Gene 3. Klasse),  $\Delta fliK$  (Regulator für flagellaren Hook) bzw.  $\Delta cheA$  (Chemotaxis-Kinase) bildeten ähnliche Strukturen aus: die Kolonien waren größer als der Wildtyp, ihre Oberfläche zeigte statt feingliedriger Fältchen vermehrt lange radial verlaufende Stege mit flachen Bereichen zwischen diesen. Die *pdeH*-Expression in der post-exponentiellen Wachstumsphase ist abhängig von FlhDC und FliA und in diesen Deletionsmutanten nicht mehr gegeben. Auch Vergleiche mit anderen PDE-Deletionsmutanten lassen vermuten, dass die beschriebene Kolonie-Struktur in Zusammenhang mit der c-di-GMP-Signaltransduktion steht (Abb. 13). Die Makrokolonie der  $\Delta cheB$ -Mutante (Chemotaxis-Response-Regulator) zeigte einen intermediären Phänotyp zwischen den Kolonien der eben beschriebenen Mutanten und dem AR3110-Wildtyp.

$\Delta fliC$  (Flagellin-Untereinheit) und  $\Delta motA$  (Komponente des Flagellen-Motors) formten kleine Kolonien mit stark ineinander verzweigten Fältchen, die im Cellulose-negativem Hintergrund von W3110 mit mangelnder Ausbildung eines Ringmusters einhergehen (Serra et al, 2013b), und damit auf leicht verringerte Synthese von Matrixsubstanzen zurückzuführen sind.  $\Delta hdfR$  (*flhDC*-Transkriptionsregulator) und

$\Delta flgM$  (anti-Sigmafaktor für FliA) bildeten eine glatte, glänzende Oberfläche aus. Besonders die  $\Delta flgM$ -Kolonie wurde deutlich weniger stark mit Congo-Rot angefärbt. Als FlhDC- respektive FliA-Repressor regulieren HdfR bzw. FlgM die Expression des Klasse-3-Gens *pdeH* negativ. Die Deletion eines dieser Regulatoren stimuliert somit die *pdeH*-Expression und damit einhergehend auch den Abbau von c-di-GMP. Makrokolonien der Deletionsmutanten  $\Delta fliZ$  (Transkriptions-Repressor),  $\Delta cheY$  (Chemotaxis-Response-Regulator/ Acetyltransferase) und  $\Delta ycgR$  (c-di-GMP-abhängige flagellare Bremse) waren vergleichbar mit *E. coli* K-12 AR3110.



**Abb. 12. Die Flagellare Gen-Kaskade moduliert die Struktur von Makrokolonien.** 5  $\mu$ l einer Übernachtskultur von AR3110 und Deletionsmutanten auf verschiedenen Ebenen der Flagellaren Expressions-Kaskade (Klasse 1:  $\Delta flhDC$ ; Klasse 2:  $\Delta flgM$ ,  $\Delta fliA$ ,  $\Delta fliZ$ ,  $\Delta fliK$ ; Klasse 3:  $\Delta fliC$ ,  $\Delta motA$ ,  $\Delta cheA$ ,  $\Delta cheB$ ,  $\Delta cheY$ ,  $\Delta ycgR$ ) und des *flhDC*-Regulators HdfR wurden auf LBnoS mit Congo-Rot für fünf Tage bei 28°C inkubiert. Als Referenz dient eine Curli- und Cellulose-negative *csgD*-Mutante. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf LBnoS mit Congo-Rot.

Das Vorhandensein funktionsfähiger Flagellen ist somit an der Entwicklung komplexer Makrokolonien in *E. coli* K-12 beteiligt. Zusätzlich kontrolliert der flagellare Transkriptionsregulator FlhDC die *pdeH*-Expression und greift damit in das c-di-GMP-Netzwerk ein. Als eigentlicher Matrixbestandteil spielen Flagellen im Makrokolonie-Biofilm jedoch nur eine untergeordnete Rolle, sind jedoch für die Adhäsion an abiotische Oberflächen und die Ausbildung von untergetauchten Biofilmen von Bedeutung, wie sie z. B. in Mikrotiter-Platten gebildet werden (Pratt & Kolter, 1998; Richter, 2011)(Richter & Hengge, unveröffentlichte Ergebnisse).

---

#### 4.2.4. c-di-GMP als Regulator von Curli Fimbrien und Cellulose

Die Synthese von Curli Fimbrien und Cellulose in *Enterobacteriaceae* wird vom intrazellulären Signalmolekül c-di-GMP reguliert (Hengge, 2009). Während die zelluläre Konzentration des Moleküls in post-exponentiell wachsenden Zellen gering ist, steigt sie mit Eintritt in die Stationärphase durch RpoS-abhängige Expression verschiedener DGCs an. Folge dessen ist die Expression des Biofilm-Regulators CsgD. Neben der Expression von *csgBAC* und der damit verbundenen Synthese amyloider Curli Fimbrien wird auch die Expression von *dgcC* (*yaiC*) durch CsgD reguliert, dessen Homolog *adrA* in *Salmonella* essentiell für die Aktivierung der Cellulose-Synthese ist (Römling et al, 2000).

##### 4.2.4.1. Die c-di-GMP-Module DgcE-PdeH und DgcM-PdeR modulieren die Synthese von Curli Fimbrien und Cellulose

In vorangegangenen Studien zur Biofilm-Bildung in *E. coli* K-12 konnte nur die Rolle von Curli Fimbrien, PGA und Flagellen näher untersucht werden, da Cellulose in diesem weit verbreiteten Laborstamm nur schwach bis gar nicht synthetisiert wird. Die zu beobachtenden Einflüsse des Signalmoleküls c-di-GMP waren damit auf die Synthese der übrigen Matrix-Komponenten limitiert. Durch Etablierung des Cellulose-produzierenden AR3110 im Rahmen dieser Arbeit konnte nun auch die Rolle der 29 GGDEF-/EAL-Proteine bei der Cellulose-Synthese in *E. coli* betrachtet werden.

Deletionsmutanten aller 29 GGDEF- und EAL-kodierenden Gene in verschiedenen genetischen Hintergründen wurden auf ihre Fähigkeit zur Biofilm-Bildung hin untersucht. Da Biofilm-Assays in Mikrotiter-Platten nur eine untergeordnete Rolle für c-di-GMP zuließen (Richter & Hengge, unveröffentlichte Daten), konzentrierte sich die Darstellung der Ergebnisse zu diesen Mutanten auf die Entwicklung von Makrokolonien. Von den 29 im *E. coli* K-12 Genom kodierten GGDEF- und EAL-Domänen-Proteine sind 12 potentielle DGCs, 13 potentielle PDEs und vier Proteine tragen stark degenerierte GGDEF- bzw. EAL-Motive. Zur besseren Übersicht

---

sind die Namen der Deletionsmutanten in Abbildung 13 und im Anhang farblich verschieden dargestellt (DGC: rot; PDE: blau; deg. Motiv: weiß; vgl. Tab A1).

Nur die Deletion von sechs der 29 GGDEF-/EAL-Protein-kodierenden Gene resultierte in der Entwicklung von Makrokolonie-Phänotypen, die stark vom AR3110-Wildtyp abwichen (Abb. 13).  $\Delta dgcE$  und  $\Delta dgcM$  entwickelten kleinere, nur wenig bis gar nicht strukturierte Kolonien aus, die jedoch noch Congo-Rot banden. Die Deletion von  $dgcC$  führte zur Ausbildung Kolonien mittlerer Größe, die ein Ringmuster ähnlich der Cellulose-negativen Stämme W3110 und AR3110  $\Delta bcsA$  bildeten (vgl. Abb. 6 & 10). Resultat der Deletion von  $pdeH$  oder  $pdeR$  waren überdurchschnittlich große, sehr flach erscheinende Kolonien, die an einige Phänotypen der Flagellen-Deletionen erinnern (vgl. Abb. 12). Auffällig waren auch hier radiale Stege, die sich vom Kolonierand hin zum Zentrum auffalteten. Bei Deletion von  $pdeK$  ( $yhjK$ ) wurden Makrokolonien ausgebildet, die sich durch ein stark verzweigtes Netzwerk kleiner Fältchen auszeichneten. Auch Mutationen in  $pdeC$  ( $yjcC$ ) bzw.  $csrD$  führten zur Ausbildung flacherer Strukturen, wenn auch nicht in dem Maße wie  $\Delta pdeH$  und  $\Delta pdeR$ . Die Rolle dieser Gene in Bezug auf die *E. coli*-Biofilm-Bildung wird bzw. wurde in den Arbeiten von Susanne Herbst bzw. Dr. Nicole Sommerfeldt-Impe näher untersucht (S. Herbst, unveröffentlicht bzw. Dissertation Dr. N. Sommerfeldt-Impe, 2012). Ein reprimierender Effekt auf die Cellulose-Synthese durch  $pdeD$  ( $yoaD$ ), wie er von (Brombacher et al, 2006) postuliert wird, konnte nicht beobachtet werden.





**Abb. 13. Makrokolonien im Curli und Cellulose produzierenden AR3110 und den entsprechenden 29 GGDEF/EAL-Gen-Deletionen.** Anzucht der Makrokolonien wie in vorhergehenden Abbildungen beschrieben. Mutationen von DGCs sind rot hervorgehoben, von PDEs blau. Mutanten der stark degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteine sind weiß dargestellt. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf LBnoS mit Congo-Rot.

Die ringförmige Struktur der Kolonie-Oberfläche im  $\Delta dgcC$ -Hintergrund war vergleichbar mit *bcsA*-Mutanten, die keine Cellulose bildeten. Auch die stark reduzierte Makrokolonie-Struktur der  $\Delta dgcE$ - und  $\Delta dgcM$ -Mutanten ließen vermuten, dass aus der Deletion dieser DGCs ebenfalls ein Cellulose-negativer Phänotyp resultierte. Bei Inkubation auf LBnoS mit Calcofluor banden auch  $\Delta dgcE$ - und  $\Delta dgcM$ -Kolonien den Farbstoff und erschienen bei UV-Bestrahlung heller (Abb. 14). Ein Cellulose-negativer Phänotyp ließ sich demnach nur für  $\Delta dgcC$  bestätigen.

Die Inkubation auf Calcofluor-Platten ist ein rein qualitativer Assay, mit dem lediglich das Vorhandensein von Exopolysacchariden (und zu einem geringeren Maße Curli

Fimbrien) nachgewiesen werden können. Eine verlässliche quantitative Bestimmung über die UV-Emission am Photometer war hingegen schwer möglich. Dennoch waren auch bei den Cellulose-bildenden Kolonien leichte Unterschiede in der Calcofluor-Bindung erkennbar. So erschienen einige PDE-Mutanten etwas heller als der Wildtyp ( $\Delta pdeB$ ,  $\Delta pdeC$ ,  $\Delta pdeG$ ,  $\Delta pdeH$ ,  $\Delta pdeK$ ,  $\Delta pdeL$ ,  $\Delta pdeN$  &  $\Delta pdeO$ ).



**Abb. 14. Calcofluor-Bindung im AR3110 und den entsprechenden 29 GGDEF/EAL-Gen-Deletionen.** Anzucht der Makrokolonien wie in vorhergehenden Abbildungen beschrieben. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 28°C auf LBnoS mit Calcofluor. Cellulose-positive Kolonien binden den fluoreszierenden Farbstoff und erscheinen heller.

Auch im Cellulose-negativen *E. coli* K-12-Stamm W3110 führte die Deletion von *dgcM* bzw. *dgcE* zu stark reduzierten Oberflächenstrukturen.  $\Delta pdeH$  und  $\Delta pdeR$  hingegen bildeten wie im AR3110-Hintergrund größere Kolonien aus, die besonders an den Rändern flächig erschienen.  $\Delta dgcC$  zeigte keine ausgeprägte Ringstruktur, bildete aber auch keine glänzenden Kolonien aus wie Deletionsmutanten der anderen beiden



DGCs. Alle übrigen Mutanten einschließlich des Wildtyps W3110 bildeten in verschiedenem Ausmaß konzentrische Ringe auf der Kolonie-Oberfläche aus, wie sie charakteristisch für Stämme sind, die nur Curli Fimbrien als Matrix Substanz bilden (Anhang Abb. A1).

Curli Fimbrien und Cellulose interagieren im extrazellulären Raum miteinander und bilden ein dichtes Netzwerk aus, was der Kolonie Gewebe-ähnliche Eigenschaften und hohe Elastizität verleiht (Serra et al, 2013a). Zusätzlich lässt die Congo-Rot-Bindung nur wenige Schlüsse über das Curli-Cellulose-Verhältnis zu. Der Einfluss zahlreicher GGDEF-/EAL-Deletionen auf die Cellulose-Synthese im AR3110 ist daher in Anwesenheit von Curli Fimbrien häufig nur schwer zu beurteilen. In einem Curli-negativen Stammhintergrund ( $\Delta csgB$ ) zeigten nach nur drei Tagen Inkubation auf LBnoS (Congo-Rot) sieben Deletionsmutanten eine etwas schwächere Struktur und Anfärbung:  $\Delta dgcC$ ,  $\Delta dgcE$ ,  $\Delta dgcJ$  (*yliF*),  $\Delta dgcM$ ,  $\Delta pdeF$  (*yfgF*),  $\Delta bluF$  und  $\Delta rfpP$ . Eine komplexere Kolonienmorphologie hingegen ziehen Deletionen der Gene *pdeH*, *pdeK* und *pdeR* nach sich (Anhang Abb. A2, oberer Bildteil). Nach sechstägiger Inkubation war nur noch für wenige Deletionsmutanten eine vom  $\Delta csgB$ -Hintergrund deutlich abweichende Morphologie und Anfärbung erkennbar, die auf Cellulose zurückzuführen ist ( $\Delta dgcC$ ,  $\Delta dgcE$ ,  $\Delta dgcM$ ,  $\Delta pdeR$ ; Anhang Abb. A2, unterer Bildteil). Neben den aus Abbildung 13 hervorgehenden sechs GGDEF-/EAL-Proteinen haben somit noch weitere einen Einfluss auf die Cellulose-Synthese. Da dieser jedoch nur im Curli-negativen Hintergrund phänotypische Auswirkungen hat und mit fortschreitender Entwicklung der Kolonie zusehends geringer wird, konzentriert sich diese Arbeit nur auf die erwähnten sechs Kandidaten (*DgcE*, *DgcM*, *DgcC*, *PdeH*, *PdeR* und *PdeK*).

Das c-di-GMP-regulierende Modul *DgcM*-*PdeR* beeinflusst durch Interaktion mit *MlrA* die Synthese von Curli und Cellulose gleichermaßen. In Abwesenheit dieses Moduls ist die Curli-Expression auf ein Basallevel reduziert (Lindenberg et al, 2013). Selbst die Deletion weiterer DGCs oder PDEs bzw. variable c-di-GMP-Spiegel durch Plasmid-kodierte Expression einer DGC bzw. PDE hat im  $\Delta dgcM\Delta pdeR$ -Hintergrund keinen Einfluss auf *csgB::lacZ* (Lindenberg et al, 2013). AR3110  $\Delta dgcM\Delta pdeR$  bildete eine großflächige Kolonie mit stark strukturierter Oberfläche. Ausgehend von der

Annahme, dass auch bei Wachstum auf Festmedium Curli Fimbrien nur basal exprimiert werden, kann der Kolonie-Phänotyp auf ein zugunsten von Cellulose verschobenes Verhältnis der Matrix-Substanzen zurückzuführen sein. Aufgrund der vermuteter geringer Curli-Expression wurde der  $\Delta dgcM\Delta pdeR$ -Hintergrund genutzt, um das Feld einzelner DGCs oder PDEs weiter eingrenzen, die spezifischen Einfluss auf die Cellulose haben. Die Untersuchung zur Makrokolonie-Bildung zeigte jedoch nur in der  $\Delta dgcM\Delta pdeR\Delta dgcC$ -Trippelmutante einen Phänotypen: die Kolonie bildete konzentrische Ringe ähnlich der  $dgcC$ -Einzelmutante aus (Anhang Abb. A3).

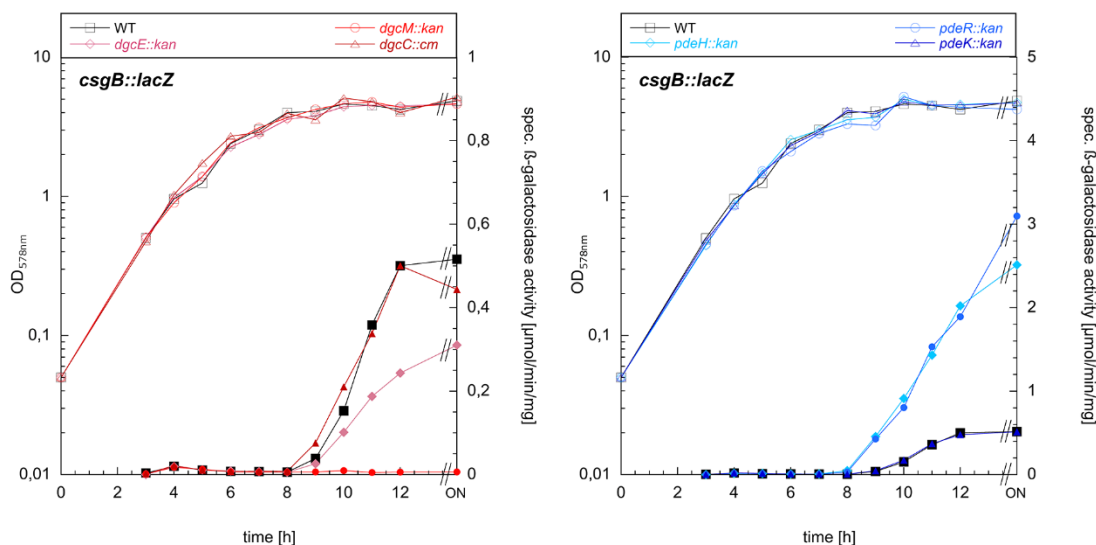
Von den 12 im *E. coli*-K12 Genom kodierten DGCs ist demnach nur DgcC essentiell für die Cellulose-Synthese, während andere DGCs wie DgcE und DgcM zwar die Expression von *csgD* regulieren, damit aber sowohl auf Curli als auch auf Cellulose wirken. Gleichzeitig zeigte sich, dass DgcC nicht nur zwingend erforderlich für die Cellulose-Synthese ist, sondern auch sehr spezifisch auf diese wirkt. Die PDEs PdeH und PdeR beeinflussen die Expression des Biofilm-Regulators CsgD negativ und modulieren damit analog zu DgcE und DgcM auch die Synthese beider Matrixsubstanzen. Einzig PdeK hat einen negativen Einfluss auf Cellulose, nicht aber auf Curli Fimbrien und stellt damit den regulatorischen Gegenspieler zu DgcC dar.

#### 4.2.4.2. *DgcC und PdeK wirken nur schwach auf die Curli-Expression*

Die c-di-GMP-Module DgcE-PdeH und DgcM-PdeR regulieren die Expression des Biofilm-Regulators CsgD. Dieser wiederum stimuliert die Expression des *csgBAC*-Operons und von *dgcC*. Der Einfluss von  $\Delta dgcE/\Delta dgcM/\Delta pdeH/\Delta pdeR$ -Mutationen auf die *csgB*-Expression wurde bereits beschrieben (Lindenberg et al, 2013; Pesavento et al, 2008; Weber et al, 2006). Nachdem die Koloniemorphologie darauf hinweist, dass DgcC und PdeK möglicherweise spezifisch auf die Cellulose-Synthese wirken, sollte ein zusätzlicher Einfluss dieser Faktoren auf die Curli-Expression quantitativ untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde die Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion in Abhängigkeit verschiedener Mutationen untersucht. Die Deletionsstämme mit der

*csgB::lacZ*-Reporterfusionen wurden in LB-Flüssigkulturen kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität entlang der Wachstumskurve bestimmt (Abb. 15). Während die Expression von *csgB::lacZ* in der exponentiellen und post-exponentiellen Phase nicht detektierbar war, stieg sie mit Eintritt in die stationäre Phase ab einer OD von etwa 3,7-4 an.  $\Delta dgcE$  zeigte eine um etwa die Hälfte reduzierte *csgB::lacZ*-Expression, während in der *dgcM*-Mutante keine Genaktivität mehr nachweisbar war.  $\Delta dgcC$  hingegen wies ein mit dem Wildtyp vergleichbares Expressionsmuster auf (Abb. 15, linker Bildteil). Ein schwacher *dgcC*-spezifischer Einfluss auf die Curli-Expression zeigte sich erst in der späten Stationärphase nach etwa 28 h Wachstum. Die Deletion der PDEs PdeH und PdeR führte zu einer verstärkten *csgB::lacZ*-Expression.  $\Delta pdeK$  hingegen hatte keinerlei Effekt auf die untersuchte Reporterfusion und war über den gesamten Probenzeitraum hinweg auf Wildtypniveau (Abb. 15, rechter Bildteil).



**Abb. 15. Die Curli-Expression wird durch verschiedene DGCs und PDEs reguliert.** Expression der *csgB::lacZ*-Reporterfusion entlang der Wachstumskurve in LB-Medium bei 28°C in Abhängigkeit verschiedener DGCs (rot) und PDEs (blau). Offene Symbole markieren die OD<sub>578</sub>, geschlossene Symbole die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. ON Übernachtwert nach 28 h Wachstum. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

DgcC und PdeK haben somit nur geringen bzw. keinen Einfluss auf die Expression von Curli Fimbrien, der mit den c-di-GMP-Modulen DgcE-PdeH und DgcM-PdeR vergleichbar ist. Für die veränderte Kolonie-Morphologie von Makrokolonien zeigte sich aber ein Einfluss beider Enzyme auf die Cellulose-Synthese. Diese wahrscheinlich

---

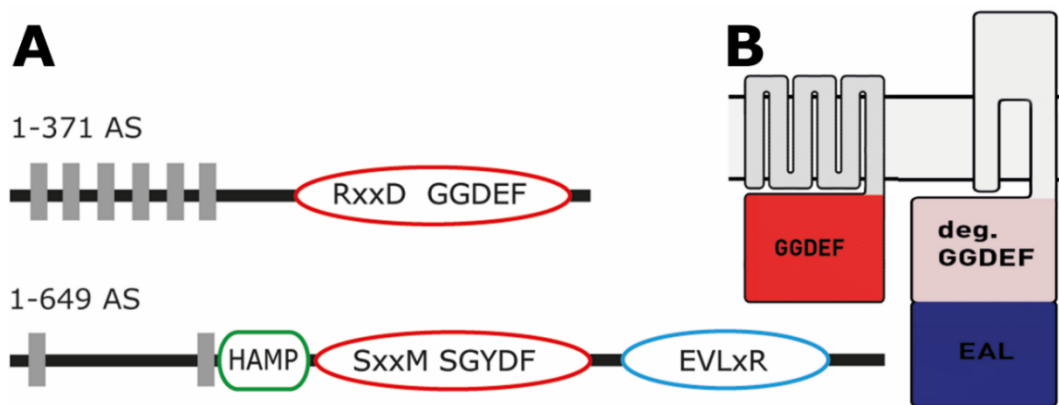
spezifische Wirkung von DgcC und PdeK auf die Synthese des Exopolysaccharids im *E. coli* K-12 sollte im Folgenden näher charakterisiert werden.

### **4.3. DgcC und PdeK wirken spezifisch auf die Cellulose-Synthese**

Ziel des nun folgenden Teils der Arbeit war es, die Wirkungsweise von DgcC und PdeK auf die Cellulose-Synthese genauer zu betrachten und zu klären, ob beide Komponenten ein weiteres Modul bilden, welches einen spezifischen Prozess in *E. coli* in Abhängigkeit von c-di-GMP reguliert.

#### **4.3.1. DgcC und PdeK sind Transmembran-Proteine**

Bioinformatische Analysen der Aminosäuresequenzen von DgcC und PdeK zeigen, dass beide Proteine N-terminal mit sechs bzw. zwei Transmembran-Domänen in der Zellmembran verankert sind. Abbildung 16 verdeutlicht die Proteinstruktur beider Enzyme und deren Lage in der inneren Zellmembran. Die Transmembran-Domänen von DgcC bilden gleichzeitig eine mit der Membran assoziierte MASE2-Sensordomäne (Nikolskaya et al, 2003), während PdeK zwischen seinen zwei Transmembran-Domänen eine weit ins Periplasma ragende GAPES3-Sensordomäne trägt (Hengge et al, 2015). Der C-terminale Teil beider Proteine ist im Cytoplasma lokalisiert. DgcC verfügt über eine GGDEF-Domäne mit konservierten I- und A-Sites (RxxD & GGDEF) während sich der cytoplasmatische Teil von PdeK aus einem HAMP-Linker, einer degenerierten GGDEF- (SxxM & SGYDF) und einer konservierten EAL-Domäne zusammen setzt. In letzterer sind sowohl das EAL-Motiv selbst als auch Bindestellen für c-di-GMP und metallische Co-Faktoren und die zur Katalyse notwendige Aminosäuren zu finden (EVLxR; Q/R/D/D; T/E)(Sommerfeldt et al, 2009).



**Abb. 16. DgcC und PdeK sind in der Membran verankerte Multi-Domänen-Proteine.** A) Organisation der Domänen von DgcC (oben) und PdeK (unten) auf Grundlage ihrer Aminosäuresequenz. Zur c-di-GMP-Umsetzung nötige Aminosäurereste sind in der roten GGDEF- bzw. der blauen EAL-Domäne angegeben. Mögliche TMDs sind als graue Rechtecke dargestellt, während die HAMP-Domäne von PdeK grün abgebildet ist. B) Beide Proteine sind mit ihren N-terminalen Helices in der Membran verankert, während der C-terminus mit GGDEF- bzw. GGDEF-EAL-Domäne ins Cytoplasma reicht.

#### 4.3.2. Untersuchungen zur c-di-GMP-abhängigen Enzymaktivität

Konservierte Protein-Domänen und für den c-di-GMP-Umsatz essentielle Aminosäuren in GGDEF- und EAL-Motiv weisen darauf hin, dass DgcC und PdeK am c-di-GMP-Metabolismus beteiligt sind. Während DgcC unter Verwendung von GTP das Signalmolekül c-di-GMP synthetisiert, sollte PdeK dieses in pGpG oder GMP abbauen. Beide wirkten im Makrokolonie-Phänotyp spezifisch auf die Cellulose-Synthese, die durch c-di-GMP aktiviert wird. Dies deutete darauf hin, dass der enzymatischen Aktivität beider Enzyme eine regulatorische Rolle bei der Cellulose-Synthese zukommt.

Die enzymatische Aktivität beider Proteine wurde *in vitro* bisher nicht dokumentiert. Im Folgenden sollten nun DgcC und PdeK auf ihre Fähigkeit, c-di-GMP zu synthetisieren bzw. abzubauen hin untersucht werden. Wie für nachfolgende Versuche wurde auch hier PdeD in die Untersuchungen mit eingeschlossen, da es in vorhergehenden Publikationen als regulatorischer Gegenspieler zu DgcC diskutiert wurde (Brombacher et al, 2006). Auch für PdeD konnte bisher keine enzymatische

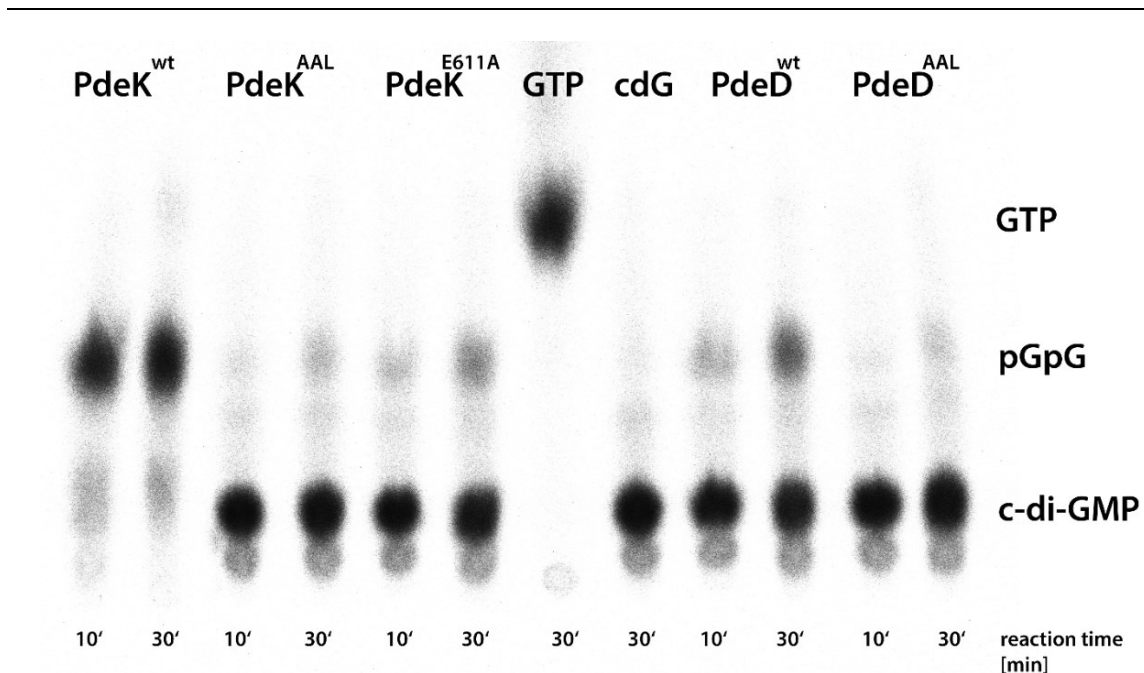
---

Aktivität gezeigt werden. Da alle drei Proteine mit der inneren Zellmembran assoziiert sind, wurde zunächst nur mit den cytoplasmatischen Domänen gearbeitet.

#### 4.3.2.1. *PdeK und PdeD sind aktive 3'-Phosphodiesterasen*

c-di-GMP-spezifische PDEs bauen dieses über das lineare Zwischenprodukt pGpG zu GMP ab (vgl. Kapitel 1.2.1). In dieser Reaktion übernimmt das EAL-Motiv die Bindung des Metall-Co-Faktors  $Mg^{2+}$  (Rao et al, 2008), während vier AS stromabwärts des EAL-Motivs für die Substrat-Bindung essentiell sind (Q/R/D/D). Zwei weitere AS-Reste bilden das eigentlich katalytisch wirksame Zentrum (T/E).

Die für die löslichen Domänen von PdeK (AS -649) und PdeD (AS -532) kodierenden Sequenzabschnitte wurden mit C-terminalem Strep-Tag in pETDUET1 kloniert, in ER2556 überexprimiert und aufgereinigt. Im PDE-Assay wurden gleiche Mengen Protein eingesetzt, die Reaktionsprodukte mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und radioaktiv markierte Produkte durch Phosphorimaging visualisiert (Abb. 17). 1  $\mu$ M PdeK setzte bereits nach 10 min [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP vollständig zu linearem pGpG um und stellt damit eine aktive PDE dar. Die Umsetzung zu GMP, welches auf Höhe von GTP läuft, war nach 30 min Inkubation in geringen Mengen nachweisbar. Auch PdeD konnte die Umsetzung zu pGpG katalysieren, jedoch bei gleichen Enzymmengen weitaus weniger effektiv als PdeK. Die enzymatische Aktivität war bei PdeK und PdeD von deren EAL-Motiv abhängig, dass bei beiden in abgewandelter Form vorliegt (EVL bei PdeK bzw. EIL bei PdeD). Die Mutation von diesem zu AAL reduzierte den Abbau ebenso stark, wie die Mutagenese eines an der Katalyse beteiligten Glutamats in PdeK (E611A).



**Abb. 17. PdeK und PdeD sind aktive PDEs und setzen c-di-GMP zu pGpG um.** Die cytoplasmatischen Domänen von PdeK (AS148-649) und PdeD (AS248-532) wurden mit C-terminalen Strep-Tag aufgereinigt und 1  $\mu$ M Protein mit 82,5 nM [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP (3000 Ci/mmol) bei 30°C inkubiert. Probenahme erfolgte nach 10 bzw. 30 min, die Reaktion wurde mit EDTA abgestoppt und die Reaktionsprodukte mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Als Kontrolle dienten [ $P^{33}$ ]-GTP und [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP (cdG). PdeK-AAL bzw. PdeD-AAL – enzym. Inaktive Variante von PdeK & PdeD durch Mutation des EAL-Motivs: EV431AA bzw. EI301AA; PdeK E611A – mutiertes an der Metall-Bindung beteiligtes Glutamat in PdeK.

#### 4.3.2.2. Membrangebundenes DgcC ist eine aktive Diguanilatzyklase

Die Glycosyltransferase BcsA wird durch Bindung von c-di-GMP aktiviert. Vorangegangene Ergebnisse wiesen darauf hin, dass DgcC dieses c-di-GMP bereitstellt. Im Verlauf dieser Arbeit sollte dementsprechend die potentielle DGC-Aktivität von DgcC *in vitro* nachgewiesen werden.

Diguanilatzyklasen sind als Homodimere enzymatisch aktiv: jeweils ein GTP bindet an eine GGDEF-Domäne, während die Dimerisierung von zusätzlichen Domänen unterstützt wird (Chan et al, 2004). Die zur DGC-Aktivität nötige GGDEF-Domäne am C-terminalen Ende von DgcC ist im Cytoplasma lokalisiert. Analog zur nachgewiesenen PDE-Aktivität der cytoplasmatischen Domänen von PdeD und PdeK konnte keine DGC-Aktivität der aufgereinigten GGDEF-Domäne von DgcC nachgewiesen werden.

(AS 180-372; C-terminaler Strep-Tag; Daten nicht gezeigt). Im Zuge dessen wurde DgcC mit seinen sechs Membran-Domänen und C-Terminalem Strep-Tag in pETDUET1 kloniert und in C41(DE3) überexprimiert und aufgereinigt. Auch mit dem in Detergenz solubilisierten Protein konnte zunächst keine *in vitro* Umsetzung von [ $P^{33}$ ]-GTP zu [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP nachgewiesen werden.

Zur Aufrechterhaltung einer natur-nahen Umgebung wurde DgcC in Nanodiscs inkorporiert. Dies sind Lipid-Bilayer-Scheibchen, die durch jeweils zwei Gürtelproteine stabilisiert werden und die Integration und funktionelle Rekonstitution von hydrophoben Membranproteinen in einer wässrigen Lösung ermöglichen (Bayburt & Sligar, 2010; Ritchie et al, 2009). Unter Verwendung von DgcC-Strep und MSP1E3D1 konnten Nanodiscs mit einem Durchmesser von 12,1 nm gewonnen werden, die DgcC als Monomere oder Dimere enthielten. Durch Quantifizierung beider Proteine in den Nanodisc-Eluaten konnten für unabhängige Aufreinigungen molare Verhältnisse von etwa 2 : 1,5 bis 2 : 1,8 (MSP1E3D1 : DgcC) ermittelt werden. Ausgehend von jeweils zwei Gürtelproteinen pro Disc zeigten diese Verhältnisse, dass etwa fünf bis acht von zehn Nanodiscs ein DgcC-Dimer enthielten, alle übrigen ein DgcC-Monomer (näheres siehe Material & Methoden).

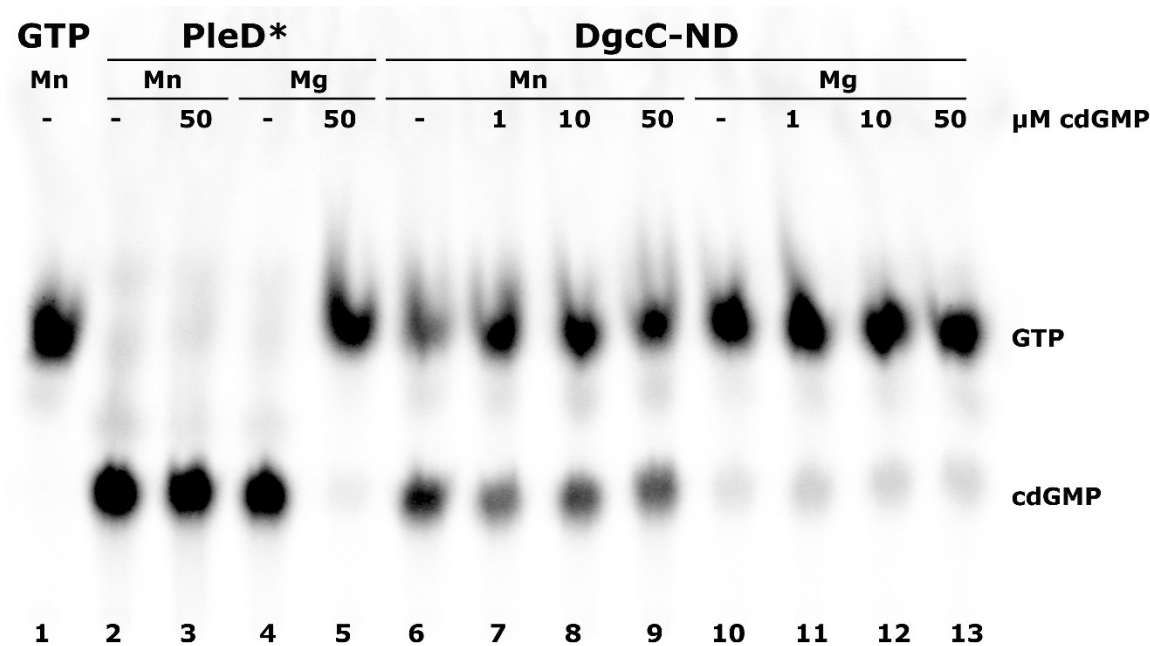
Die DGC-Aktivität wurde durch die Umsetzung von [ $P^{33}$ ]-GTP zu [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP und die anschließende Auftrennung der Reaktionsprodukte mittels Dünnschicht-Chromatographie nachgewiesen. Als Kontrolle diente PleD\*-6xHis, eine konstitutiv aktive Variante der cytoplasmatischen DGC PleD von *C. crescentus* (2.-5. Spur)(Christen et al, 2005). Die Inkorporation von DgcC in Nanodiscs (DgcC-ND) und die Verwendung dieser mit [ $P^{33}$ ]-GTP als Substrat ermöglichte den *in vitro*-Nachweis der enzymatischen DGC-Aktivität (Abb. 18). Zusätzlich zeigte sich, dass  $Mn^{2+}$  gegenüber  $Mg^{2+}$  einen bevorzugten Metall-Co-Faktor für die DGC-Reaktion darstellte und in gleicher Reaktionszeit mehr c-di-GMP gebildet wurde (6. Spur und 10. Spur).

Neben einer konservierten A-Site verfügt DgcC zusätzlich über eine I-Site (RxxD-Motiv). Durch Bindung von c-di-GMP kann so die DGC-Reaktion allosterisch gehemmt werden (vgl. Kapitel 1.2.1). Die Zugabe von nicht markierten c-di-GMP in Konzentrationen von bis zu 50  $\mu M$  im DGC-Assay reduzierte jedoch die Synthese von



c-di-GMP durch DgcC kaum (7.-9. und 11.-13. Spur). Eine Produkt-Inhibierung ist demnach nur schwach, wenn überhaupt vorhanden.

Die Inhibierung von PleD\* durch c-di-GMP ist hingegen abhängig vom genutzten Co-Faktor: eine Mg<sup>2+</sup>-abhängige DGC-Reaktion lässt sich in Anwesenheit von 50 µM c-di-GMP nicht mehr detektieren, Mn<sup>2+</sup> hingegen eliminiert die Produktinhibition. Denkbar wäre hier, dass Mangan zwar die GTP-Bindung und DGC-Reaktion stimuliert, der Interaktion von c-di-GMP an der I-Site jedoch entgegenwirkt.

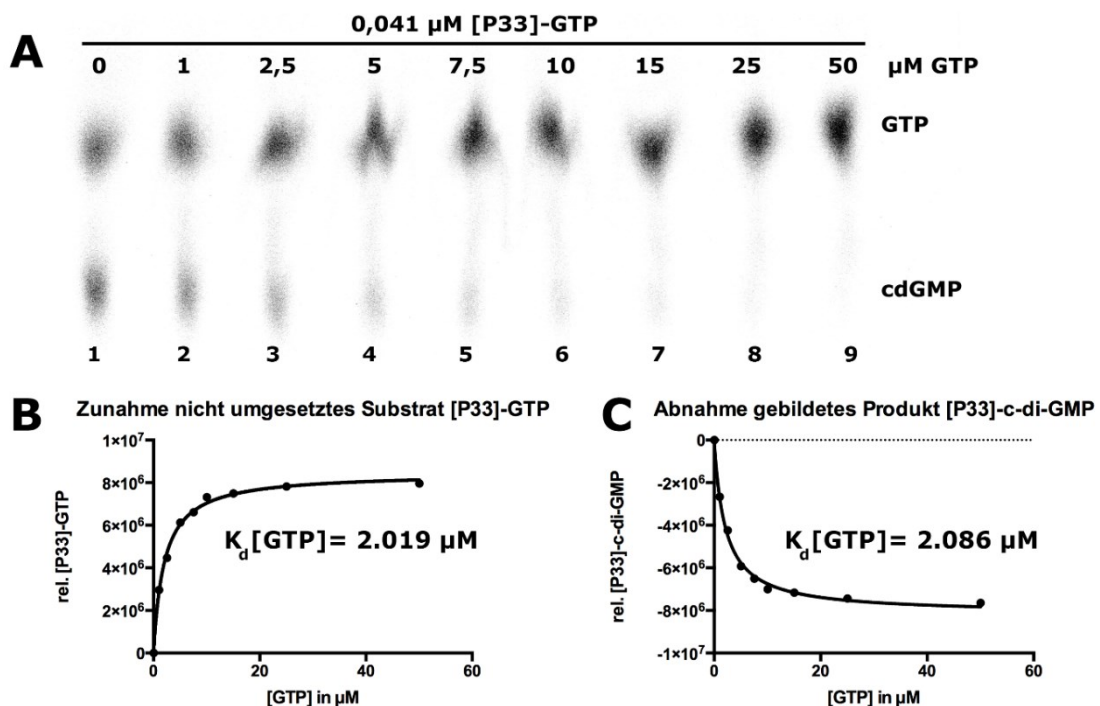


**Abb. 18. Membran-gebundenes DgcC setzt GTP zu c-di-GMP um.** 3,5 µM aufgereinigtes DgcC-Strep in Nanodiscs wurde mit 82,5 nM [P<sup>33</sup>]-GTP (3000 Ci/mmol) für 60 min bei 30°C inkubiert, die Reaktion mit EDTA abgestoppt und die Reaktionsprodukte mittels Dünnschicht-Chromatografie aufgetrennt. Als Kontrolle dienten [P<sup>33</sup>]-c-di-GMP (cdG) und 1 µM PleD\*-6xHis (Christen et al. 2005). Mn – Mangan als Co-Faktor; Mg – Magnesium als Co-Faktor der DGC-Reaktion.

Um die Substrat-Affinität und damit die GTP-Bindefähigkeit von DgcC genauer zu untersuchen, wurden Reaktionsansätze mit gleichen Mengen Protein und [P<sup>33</sup>]-GTP mit steigenden Mengen nicht radioaktiv-markiertem GTP (1-50 µM) inkubiert. [P<sup>33</sup>]-GTP und das im Überschuss vorliegende nicht radioaktiv-markiertes GTP konkurrierten in diesen Ansätzen um die Bindung an DgcC und die Umsetzung zu c-di-GMP, wobei jedoch nur radioaktiv-markiertes GTP bzw. c-di-GMP auf der Dünnschichtplatte nachgewiesen und quantifiziert werden konnte. Die Reaktionszeit

wurde im Vergleich zum vorhergehenden Versuch auf 15 min herabgesetzt. Ausgehend von Vorversuchen konnte in dieser Zeit noch eine maximale Umsatzgeschwindigkeit nachgewiesen werden.

Ausgehend davon, dass ohne Zugabe von nicht-markierten GTP alles gebildete c-di-GMP mittels Phosphorimaging nachweisbar war (1. Spur), nahm dessen Signal mit steigenden Mengen „kalten“ GTPs ab (2.-9. Spur), da vermehrt dieses als Substrat genutzt wurde (Abb. 19). Bereits bei Zugabe von 2,5  $\mu\text{M}$  kaltem GTP reduziert sich das [ $\text{P}^{33}$ ]-c-di-GMP-Signal bereits um mehr als die Hälfte (3. Spur). Die Dissoziationskonstante  $K_d$  konnte somit unter Berücksichtigung von Zunahme nicht umgesetztem [ $\text{P}^{33}$ ]-GTPs bzw. Abnahme an gebildetem [ $\text{P}^{33}$ ]-c-di-GMPs berechnet werden und betrug etwa 2,0  $\mu\text{M}$ . Ausgehend von den aus der Literatur bekannten GTP-Konzentrationen, die sich je nach Wachstumsphase zwischen 0,4 mM und 1,66 mM bewegen, kann somit angenommen werden, dass eine Sättigung von DgcC mit GTP vorliegt (Buckstein et al, 2008).



**Abb. 19.** DgcC in Nanodiscs setzt GTP mit einer  $K_d$  von 2,0  $\mu\text{M}$  um. A) 3,4  $\mu\text{M}$  aufgereinigtes DgcC-Strep in Nanodiscs wurde mit 41 nM [ $\text{P}^{33}$ ]-GTP (3000 Ci/mmol) und den angegebenen Mengen nicht-markiertem GTP für 15 min bei 30°C inkubiert, die Reaktion mit EDTA abgestoppt und die Reaktionsprodukte mittels Dünnschicht-Chromatografie aufgetrennt. B) Die Intensität der

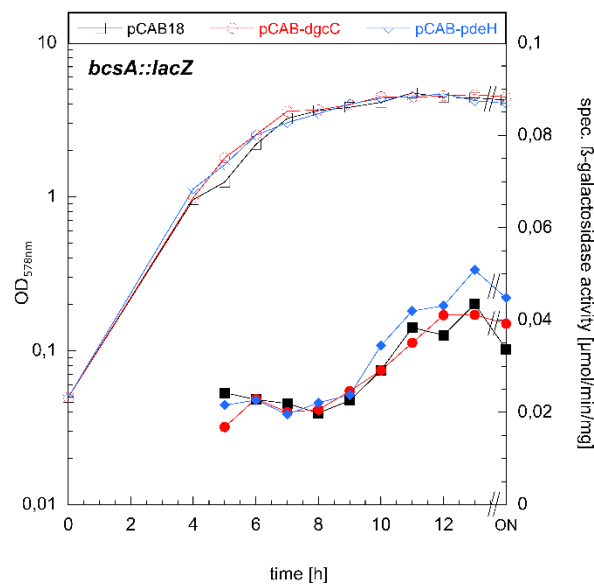
radioaktiven Signale wurde mit ImageQuant TL Array Analysis v8.1 quantifiziert und ausgehend von diesen Werten und den eingesetzten GTP-Gesamtkonzentrationen die  $K_d$  mittels Prism6 berechnet. Ausgehend von der Zunahme an nicht umgesetzten [ $P^{33}$ ]-GTP ergibt sich eine  $K_d$  von 2,016  $\mu\text{M}$  (+/-0,143). C) Wird die Menge an radioaktiv nachweisbarem Produkt, [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP, für die Berechnung genutzt, ergibt sich eine  $K_d$  von 2,086  $\mu\text{M}$  (+/-0,157). rel. [ $P^{33}$ ]-GTP bzw. rel. [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP beschreibt die Signalstärke des radioaktiv nachweisbaren Substrats/Produkts in Abhängigkeit von steigenden Mengen GTP, welches sich aus 41 nM radioaktiv-markierten und steigenden Mengen nicht radioaktiv-markierten zusammensetzt ([GTP] in  $\mu\text{M}$ ). Die DGC-Reaktion erfolgte mit Mn als Co-Faktor.

#### 4.3.3. c-di-GMP reguliert die Cellulose-Synthese auf post-translationaler Ebene

Während die Synthese von Curli-Fimbrien auf Ebene der *csgD*-Transkription durch c-di-GMP reguliert wird, greift das Signalmolekül bei der Cellulose-Produktion auf post-translationaler Ebene durch Aktivierung von BcsA in diese ein (vgl. Kapitel 1.3). Eine Regulation durch c-di-GMP auf transkriptionaler Ebene wie sie etwa für PGA bekannt ist, wurde für Cellulose bisher nicht beschrieben. Um einen zusätzlichen c-di-GMP-abhängigen Einfluss auf die Expression der *bcs*-Gene dennoch ausschließen zu können, wurde die Expression einer *bcsA::lacZ*-Reporterergenfusion in Abhängigkeit zellulärer c-di-GMP-Spiegel untersucht (vgl. Abb. 8 & 9: *ARbcsA::lacZ*).

Zur Erzeugung hoher bzw. niedriger c-di-GMP-Spiegel wurden pCAB-*dgcC* bzw. pCAB-*pdeH* genutzt, die auch schon in vorhergehenden Arbeiten für ähnliche Fragestellungen verwendet wurden (Lindenberg et al, 2013; Tschowri et al, 2009). Hierbei handelt es sich um Niedrig-Kopie-Vektoren, deren MCS der Kontrolle eines *taq*-Promoters unterliegt, der auch ohne Zugabe von IPTG die Expression zulässt (Barembuch & Hengge, 2007). Stämme mit *bcsA::lacZ*-Reporterergenfusionen wurden mit jeweils einem dieser Plasmide transformiert und die Genaktivität entlang der Wachstumskurve quantifiziert und mit einem Stamm, der das Leerplasmid pCAB-18 trug, verglichen. In dreimal unabhängig voneinander durchgeführten Assays konnte kein Einfluss erhöhter oder verringerter c-di-GMP-Spiegel auf die *bcsA::lacZ*-Expression beobachtet werden (Abb. 20).

Von diesen Daten kann abgeleitet werden, dass der Effekt zellulärer c-di-GMP-Spiegel gemäß den Erwartungen keinen Einfluss auf die Expression des *yhjR-bcsQABZC*-Operons hat. Die Regulation durch c-di-GMP findet demnach lediglich auf post-translationaler Ebene statt. Weiterhin kann angenommen werden, dass DgcC und PdeK dieses c-di-GMP synthetisieren bzw. abbauen und aufgrund dessen spezifisch auf die Cellulose-Synthese wirken.



**Abb. 20. *bcsA::lacZ* wird nicht durch zelluläre c-di-GMP-Spiegel reguliert.** Expression der *bcsA::lacZ*-Reporterfusion entlang der Wachstumskurve in LB-Medium mit Ampicillin bei 28°C in Abhängigkeit hoher (rot) und niedriger (blau) c-di-GMP-Spiegel durch Expression einer plasmidkodierten DGC bzw. PDE. Offene Symbole markieren die OD<sub>578</sub>, geschlossene Symbole die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität. ON Übernachtwert nach 28 h Wachstum. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

#### 4.4. Protein-Interaktionsstudien zwischen DgcC, PdeK und dem Cellulose-Komplex

Das *E. coli* K-12-Genom kodiert für 29 GGDEF-/EAL-Domänen-Proteine, von denen 25 konservierte Aminosäuren tragen, die für Synthese bzw. Abbau von c-di-GMP essentiell sind und damit potentiell am Umsatz des Signalmoleküls beteiligt sind. Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass einzig DgcC und PdeK spezifisch auf die Synthese der Matrix-Komponente Cellulose wirken. Beide Proteine

sind enzymatisch aktiv und wie der Cellulose-Synthese-Komplex BcsA-BcsB Bestandteil der inneren Zellmembran.

Die Rekrutierung von DGCs und PDEs hin zu ihren Wirkungsorten kann eine Erklärung dafür bieten, warum einige Enzyme sehr spezifische Phänotypen haben. So wird die Spezifität von DgcM und PdeR auf die *csgD*-Expression durch Protein-Protein-Interaktionen mit dem Transkriptionsregulator MlrA gewährleistet (Lindenberg et al, 2013). Ähnliches gilt für DgcO und PdeO und deren Wirkmechanismus auf das Degradosom (Tuckerman et al, 2011). Ausgehend davon stellte sich die Frage, ob auch die spezifische Regulation der Cellulose-Synthese durch DgcC und PdeK von Protein-Protein-Interaktionen zwischen diesen und dem BcsA-BcsB-Komplex herrührt.

#### **4.4.1. DgcC und PdeK interagieren über BcsB mit dem Cellulose-Synthese-Komplex**

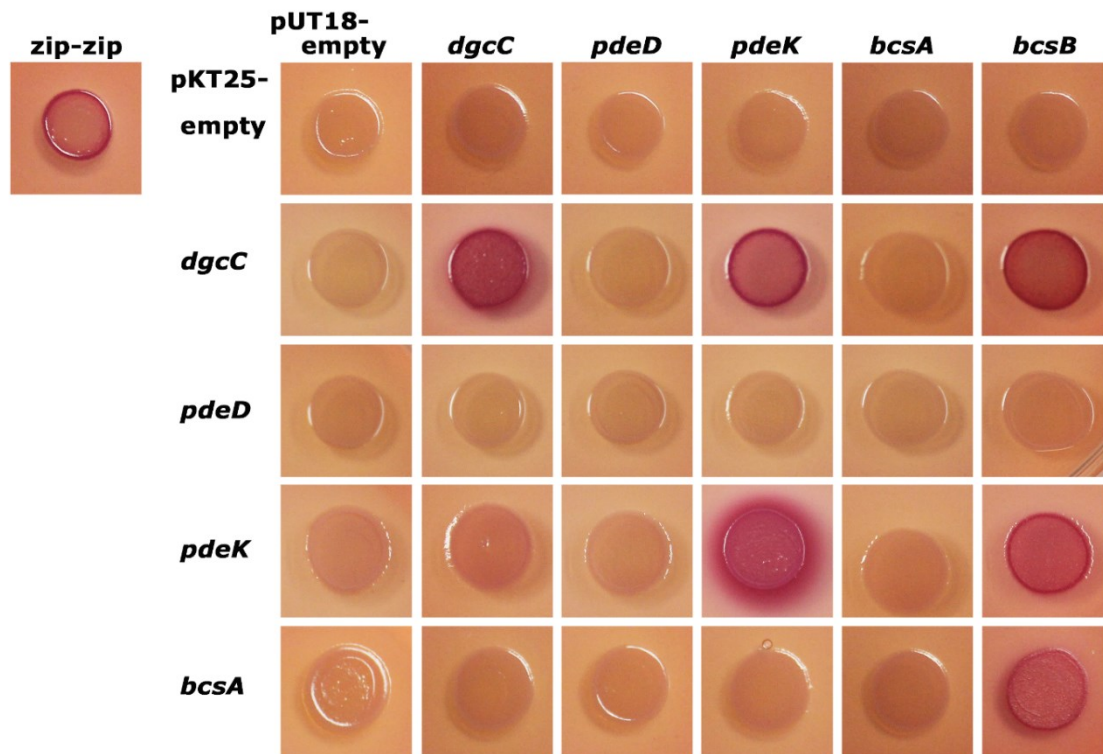
Alle zu testenden Proteine sind mit bis zu acht Transmembran-Helices in der inneren Zellmembran verankert. Protein-Interaktions-Assays, die auf Fusionsproteinen mit der RNA-Polymerase basieren, sind demnach ungeeignet, da sie die Lokalisation der zu testenden Protein-Partner an der DNA voraussetzen. Als Alternative wurde im Verlauf dieser Arbeit ein Bacterial-Two-Hybrid-System in der AG Hengge etabliert, welches auf dem Signalmolekül cAMP basiert und die Untersuchungen von Interaktionen zwischen cytoplasmatischen und Membran-gebundenen Proteinen gleichermaßen gewährleistet (Karimova et al, 1998)(vertrieben von EUROMEDEX). In diesem Assay wurden die zwei zu testenden Proteine mit jeweils einem Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatzyklase von *B. pertussis* fusioniert (T25: AS 1-224; T18: AS 225-399 von CyaA). Bei Verwendung von pKT25 bzw. pUT18C wurde das CyaA-Fragment an den N-Terminus des zu testenden Proteins fusioniert (T25-X bzw. T18C-X), während pUT18 zur Klonierung eines C-terminal-markierten Fusionsproteins diente (X-T18). Getrennt voneinander sind beide Cyclase-Domänen nicht aktiv, können aber Heterodimere bilden und cAMP synthetisieren, sofern sie an interagierende Proteine fusioniert werden. cAMP kann unabhängig vom Syntheseort durch die Zelle diffundieren und an CAP binden. Der cAMP-CAP-Komplex wiederum ermöglicht die

---

Aufnahme und Verstoffwechselung alternativer Kohlenstoffquellen, was durch Rotfärbung von Kolonien auf MacConkey-Agar visualisiert werden kann (näheres siehe Materialien & Methoden).

Die Interaktion der Cellulose-Synthase BcsA mit der Co-Synthase BcsB ist durch Aufklärung der Röntgenkristallstruktur beider Proteine durch die Arbeitsgruppe um Jochen Zimmer dokumentiert worden und konnte in diesem Versuchsaufbau bestätigt werden (Morgan et al, 2012; Omadjela et al, 2013)(Abb. 21). Darüber hinaus konnte eine Dimerisierung von DgcC und von PdeK gezeigt werden. Zusätzlich wurde auch eine Interaktion von DgcC mit PdeK beobachtet, die sich jedoch nur in der Plasmidkombination pUT18C-*pdeK* & pKT25-*dgcC* nachweisen ließ.

Weder für DgcC noch für PdeK konnte eine Interaktion mit der Cellulose-Synthase BcsA beobachtet werden. Interessant ist jedoch, dass sowohl DgcC als auch PdeK mit der Co-Synthase BcsB interagieren, welche seinerseits einen Komplex mit BcsA ausbildet. Neben der von Omadjela et al. postulierten Stabilisierungs-Funktion von BcsB scheint der Co-Polymerase dementsprechend auch eine Rolle bei der Rekrutierung regulatorischer Komponenten zuzukommen (Omadjela et al, 2013). Eine Interaktion aller getesteten Komponenten mit PdeD, welches in vorhergehenden Publikationen als Cellulose-spezifisch diskutiert wurde (Brombacher et al, 2006), konnte nicht beobachtet werden.



**Abb. 21. DgcC und PdeK interagieren mit dem Cellulose-Synthese-Apparat.** *In-vivo* Protein-Interaktionsassay nach Karimova et al, (1998). W3110  $\Delta$ *cyaA*-Zellen wurden mit pKT25- und pUT18(C)-Derivaten co-transformiert (pUT18C-*yhjK*, alle übrigen in pUT18). Transformanten mit beiden Plasmiden wurden in 0,9% NaCl suspendiert und 3-5  $\mu$ l auf MacConkey mit 1% Maltose, Ampicillin und Kanamycin getropft und für 24 h bei 28°C inkubiert. Interaktionen der Fusionsproteine komplementierten die *cyaA*-Deletion, was die Umsetzung von Maltose möglich macht und die Kolonien rot färbt. Als Positiv-Kontrolle diente die Leucin-Zipper-Region des Hefeproteins GCN4, als Negativ-Kontrolle Leerplasmide.

DgcC und PdeK sind mit der inneren Zellmembran assoziiert, während ihre enzymatisch-aktiven Domänen (GGDEF bzw. deg. GGDEF & EAL) im Cytoplasma lokalisiert sind (Abb. 16). Darüber hinaus besitzt PdeK eine ins Periplasma reichende GAPES3-Domäne. Da all diese Domänen potentiell an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt sein können, wurde der Interaktions-Assay mit verkürzten Protein-Varianten wiederholt. Im Zuge dessen sollte genauer eingegrenzt werden, welche Domänen von DgcC bzw. PdeK an den beobachtenden Interaktionen beteiligt sind.

DgcC- $\Delta$ *cyt* entspricht einer DgcC-Variante ohne cytoplasmatische GGDEF-Domäne ( $\Delta$ AS201-372) und kodiert nur für die sechs Transmembran-Helices, die die MASE2-Domäne bilden. PdeK- $\Delta$ *cyt* setzt sich aus Transmembran- und Periplasma-

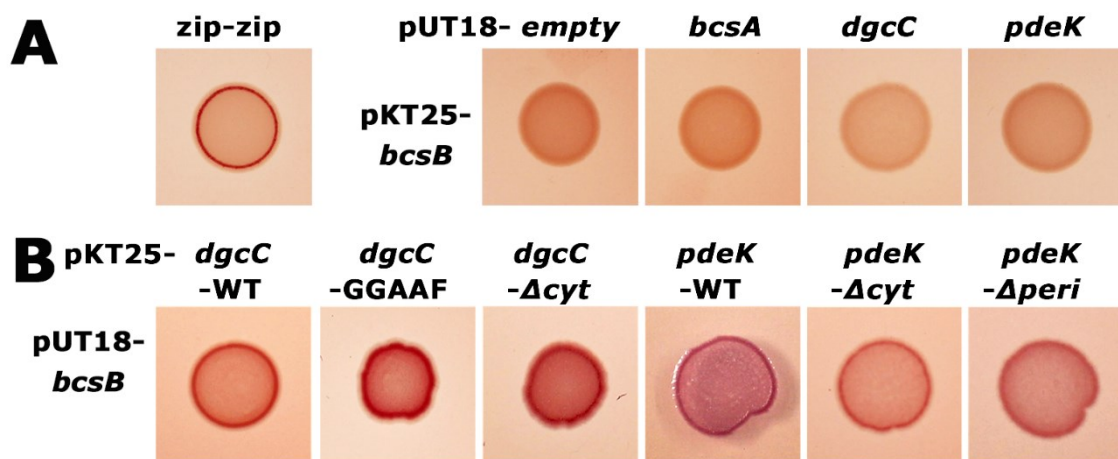
---

Domäne zusammen, es fehlen cytoplasmatische HAMP-, GGDEF- und EAL-Domäne ( $\Delta AS181-649$ ). Eine in-Frame-Deletion der periplasmatischen Domäne von PdeK stellt PdeK-*Aperi* dar ( $\Delta AS26-136$ ). Darüber hinaus wurden durch Mutation einzelner Aminosäuren enzymatisch inaktive Protein-Derivate in pUT18 und pKT25 kloniert und im Assay getestet (DgcC: GGDEF  $\rightarrow$  GGAAF; PdeK: EVL  $\rightarrow$  AAL). Da sich die PdeK-AAL-Variante in allen Protein-Interaktionen identisch zum Wildtyp-Protein verhielt, wurden die entsprechenden Ergebnisse hier der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet.

*bcsB* kodiert für ein Protein mit N-terminaler Signalsequenz, welches nur mit einer C-terminalen Membran-Domäne in dieser verankert ist. Der übrige Teil des Proteins befindet sich im Periplasma. Bei Verwendung von pKT25 oder pUT18C wird das CyaA-Fragment an den N-Terminus fusioniert (s.o.) und im Fall von BcsB bei post-translationaler Prozessierung zusammen mit der Signalsequenz entfernt. Eine Interaktion von T18 und T25 und die Synthese von cAMP ist demnach nicht möglich. Die zuvor beobachteten Interaktionen von BcsB mit BcsA, DgcC und PdeK konnten bei Verwendung von pKT25-*bcsB* nicht reproduziert werden (Abb. 22A).

Infolgedessen konnte für *bcsB*-Interaktionsstudien nur pUT18 verwendet werden, da das daraus resultierende Fusionsprotein das T18-Fragment am C-Terminus trägt. Für alle Protein-Varianten von DgcC und PdeK konnte eine Interaktion mit BcsB nachgewiesen werden. Mutation einzelner Aminosäuren oder Deletion ganzer Domänen hatte nur geringe Auswirkungen auf die Intensität der Interaktion. Die Mutation des GGDEF-Motivs oder die Deletion der gesamten GGDEF-Domäne verstärkten die DgcC-BcsB-Interaktion nur leicht. Im Gegensatz dazu resultierte die Deletion der cytoplasmatischen Domäne von PdeK in einer etwas abgeschwächten Interaktion mit BcsB (Abb. 22B).





**Abb. 22. DgcC und PdeK interagieren unabhängig von ihren cytoplasmatischen Domänen mit BcsB.** *In-vivo* Protein-Interaktionsassay nach Karimova et al (1998; vgl. Abb. 21) unter Verwendung verschiedener Varianten von *dgcC* und *pdeK*. A) pKT25-*bcsB* kodiert für eine N-terminale Signalsequenz, die zusammen mit T25 abgespalten wird. Ein Nachweis potentieller Interaktionen ist mit pKT25-*bcsB* nicht möglich. B) Kombination von pUT18-*bcsB* mit verschiedenen Varianten von *dgcC* und *pdeK* auf pKT25. WT – Wildtypprotein; GGAFF – enzymatische inaktives Protein (*dgcC*: DE291AA);  $\Delta$ *cyt* – Deletion der cytoplasmatischen Domänen (*dgcC*:  $\Delta$ AS201-372/*pdeK*:  $\Delta$ AS181-649);  $\Delta$ *peri* – Deletion der periplasmatischen Domäne ( $\Delta$ AS26-136).

Basierend auf diesen Daten kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass cytoplasmatische bzw. periplasmatische Domänen von DgcC und PdeK für eine Interaktion mit BcsB nicht benötigt wurden. An der Bildung eines Komplexes waren vielmehr die Transmembran-Domänen der einzelnen Partner beteiligt.

#### 4.4.2. DgcC und PdeK dimerisieren mittels ihrer Transmembran-Domänen

Für die Aktivität von DGCs ist die Ausbildung von Dimeren erforderlich, bei denen die GGDEF-Domäne jeder Untereinheit ein GTP bindet (Chan et al, 2004). Für einige PDEs hingegen wurde auch enzymatische Aktivität in Monomeren gezeigt, während andere ebenfalls nur als Dimer aktiv sind (Barends et al, 2009; Rao et al, 2008; Schmidt et al, 2005; Tchigvintsev et al, 2010). Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zur Dimerisierung von DgcC und PdeK sind dementsprechend nicht ungewöhnlich. Auch für die Ausbildung von DgcC- bzw. PdeK-Homodimeren sollte im Folgenden die Rolle

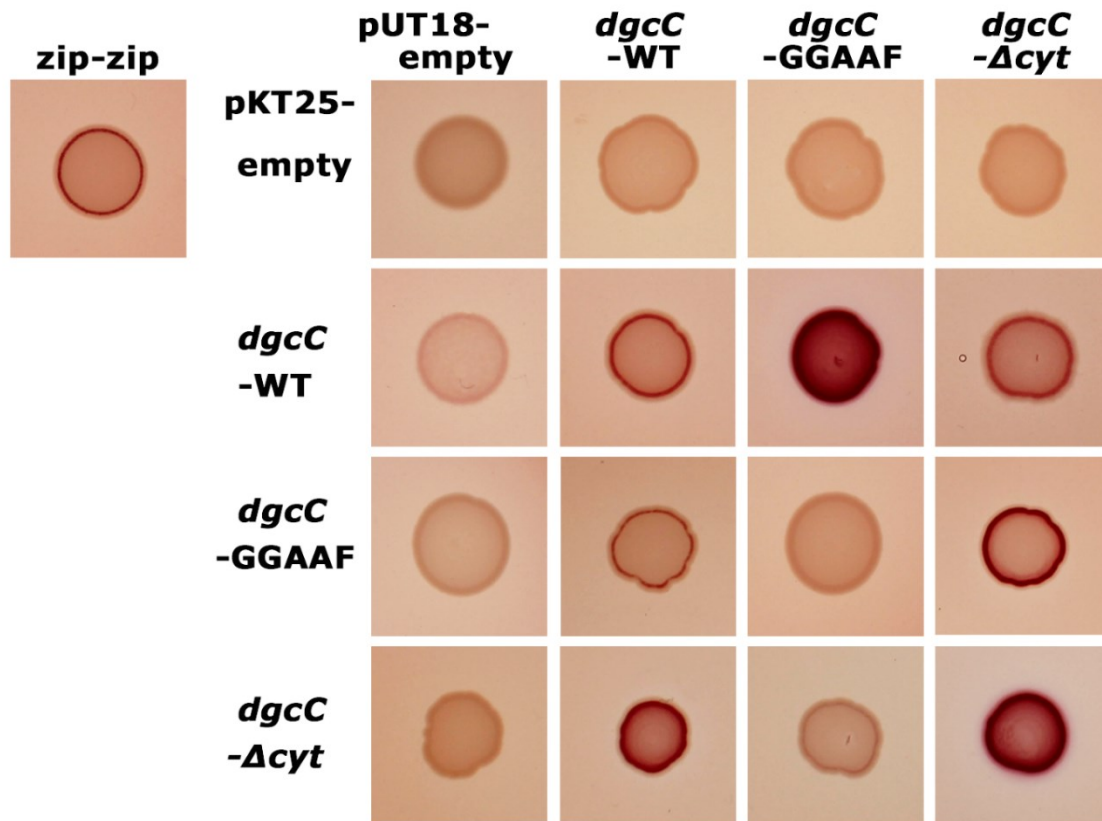
der einzelnen Domänen anhand verschiedener Protein-Varianten im Interaktionsassay untersucht werden.

Die enzymatische Aktivität von DgcC-GGDEF-Domänen alleine konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.3.2), was vermuten lässt, dass i.) die Membranständige Sensor-Domäne essentiell für die DGC-Aktivität ist und/oder ii.) die GGDEF-Domänen allein nicht dimerisieren. Aus den in Abbildung 23 gezeigten Daten wird deutlich, dass DgcC auch ohne cytoplasmatischer GGDEF-Domäne interagiert. Darüber hinaus resultierten Plasmid-Kombination von Wildtyp-Variante, mutiertem GGAAF-Motiv und verkürzten DgcC- $\Delta$ cyt-Version in fast allen Fällen in der Rotfärbung der Kolonien, was für Interaktionen zwischen den Fusions-Proteinen spricht.

Während die Interaktion zwischen T25-DgcC- $\Delta$ cyt und DgcC-(GGAAF)-T18 nur schwach erkennbar ist, zeigen die Fusions-Proteine T25-DgcC-(GGAAF) und DgcC- $\Delta$ cyt-T18 rote Kolonien. Bei Verwendung von pKT25 ist das N-terminale T25-Fragment im Fall von Membranproteinen nahe an der Membran gelegen, während das zur cAMP-Synthese nötige T18-Fragment bei DgcC-(GGAAF)-T18 weit ins Cytoplasma ragt. Bei DgcC- $\Delta$ cyt-T18 hingegen ist T18 durch Deletion der cytoplasmatischen Domäne näher an der Membran, was die Interaktion mit T25 erleichtern könnte. Die Interaktion lässt sich somit im Assay anhand der rot gefärbten Kolonien besser detektieren. Sofern in den folgenden Assays nur eine der beiden Plasmid-Kombinationen positive Interaktionen anzeigte, wurde das als positive Interaktion beider Proteine *in vivo* interpretiert. Eine schwächere Interaktion der anderen Kombination wurde in diesen Fällen mit der ungünstigen Lage der beiden Adenylatzyklase-Fragmente in Relation zueinander erklärt. Zusammenfassend zeigt sich demnach, dass weder ein konserviertes GGDEF-Motiv noch die cytoplasmatische Domäne für die DgcC-DgcC-Interaktion essentiell sind.

Vom Wildtyp-Protein abweichende Ergebnisse waren außerdem für DgcC-GGAAF-T18 zu beobachten (vgl. 2. und 3. Spalte), welches das T-18-Fragment an der mutierten GGAAF-Domänen trug. Die Mutation des GGDEF-Motivs unterbindet die DGC-Aktivität des Enzyms und stört möglicherweise die Flexibilität innerhalb des Proteins, was Auswirkungen auf das C-terminale T18-Fragment und dessen Interaktion mit dem

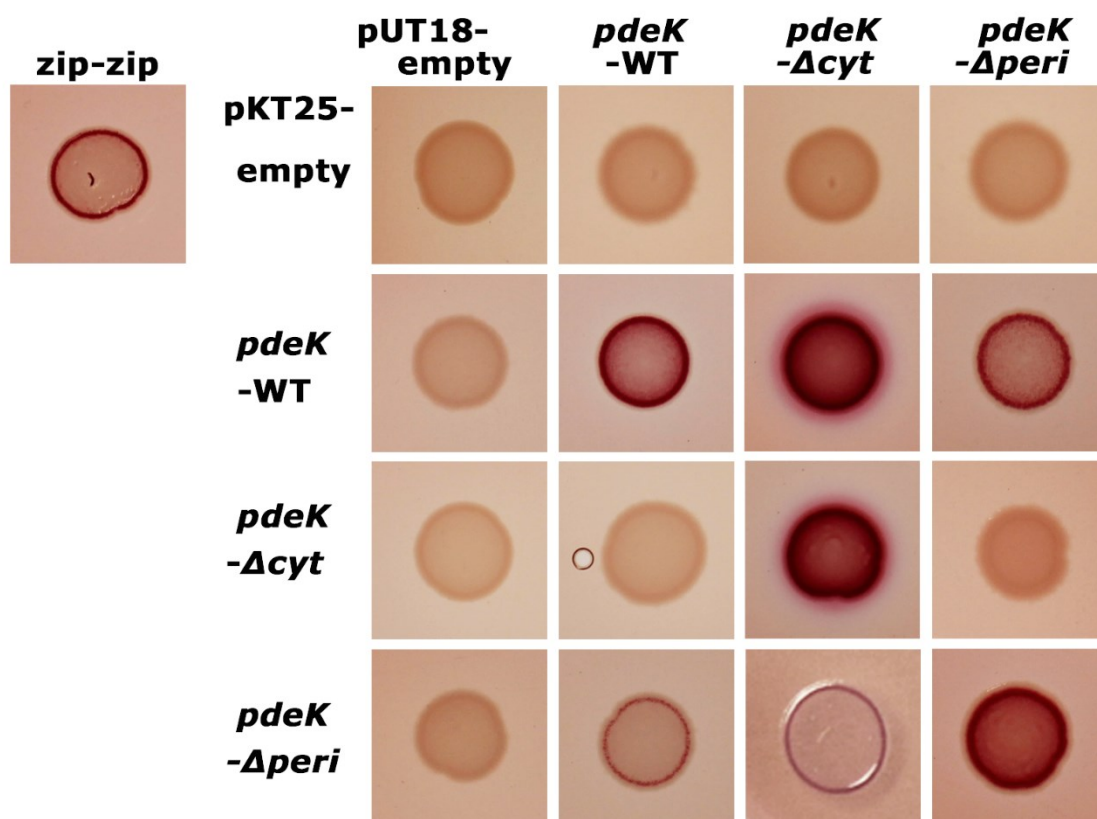
T25-Fragment des Partners haben könnte. Sofern beide Fusions-Proteine das mutierte Motiv trugen, wurde die Interaktion weiter inhibiert, während sich T25-DgcC-GGAFF mit N-terminalem T25 wie der Wildtyp verhielt.



**Abb. 23. DgcC dimerisiert innerhalb der inneren Zellmembran.** *In-vivo* Protein-Interaktionsassay nach Karimova et al (1998; vgl. Abb. 21) mit verschiedenen Varianten von *dgcC* auf pKT25 bzw. pUT18. WT – Wildtypprotein; GGAFF – enzymatische inaktives Protein DE291AA;  $\Delta$ *cyt* – Deletion der cytoplasmatischen Domäne ( $\Delta$ AS201-372).

Analog zu DgcC konnte gezeigt werden, dass an der PdeK-PdeK-Interaktion ebenfalls weder die cytoplasmatische Domäne (Hamp-Linker & degen. GGDEF- & konserv. EAL-Domäne) beteiligt war, noch war die enzymatische Aktivität essentiell (Abb. 24 und Daten nicht gezeigt). Eine schwächere Interaktion von T25-PdeK- $\Delta$ *cyt* mit den auf pUT18 kodierten PdeK-Varianten (ausgenommen PdeK- $\Delta$ *cyt*-T18) kann mit dem bereits für DgcC beschriebenen Phänomen erklärt werden: PdeK verfügt über eine mehr als 450 AS lange lösliche Domäne, die weit ins Cytoplasma reicht, was eine Interaktion mit Membran-assoziierten T25-Fragmenten erschwert. Sofern nur einer der

Interaktions-Partner über eine periplasmatische Domäne verfügt, ist die Interaktion abgeschwächt. Wenn jedoch keines der Fusions-Proteine die Periplasma-Deletion trägt, interagieren sie vergleichbar gut miteinander wie die Wildtyp-Varianten. Periplasmatische Sensordomänen dienen der Wahrnehmung von Reizen z. B. durch Liganden-Bindung. Verfügt nur ein Interaktions-Partner über solch eine Domäne, könnten etwaige Konformationsänderungen aufgrund von Liganden-Bindung die Dimerisierung mit dem Partner unterbinden.



**Abb. 24. PdeK dimerisiert innerhalb der inneren Zellmembran.** *In-vivo* Protein-Interaktionsassay nach Karimova et al (1998; vgl. Abb. 21) mit verschiedenen Varianten von *pdeK* auf pKT25 bzw. pUT18. WT – Wildtypprotein; AAL – enzymatische inaktives Protein EV431AA;  $\Delta cyt$  – Deletion der cytoplasmatischen Domänen (AS181-649);  $\Delta peri$  – Deletion der peripl. Domäne ( $\Delta AS26-136$ ).

Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass bei der Dimerisierung von DgcC und von PdeK die Transmembran-Domänen der Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Periplasmatische bzw. cytoplasmatische Domänen sind nicht essentiell für die Interaktion, können diese aber beeinflussen.

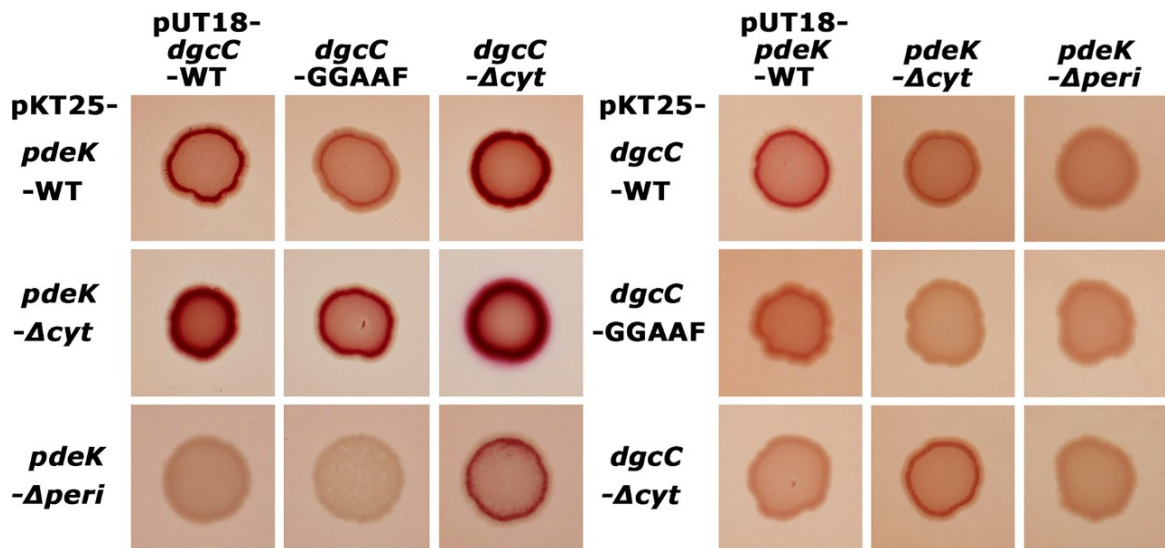
#### 4.4.3. DgcC und PdeK bilden einen Komplex innerhalb der Membran

Neben der Ausbildung von Homodimeren (DgcC-DgcC und PdeK-PdeK) wurde auch die Interaktion zwischen DgcC und PdeK beobachtet. Im Folgenden wurden nun die oben beschriebenen DgcC- und PdeK-Varianten im Interaktionsassay miteinander kombiniert und mit den Wildtyp-Proteinen verglichen (Abb. 25). Die Interaktionen von pKT25-*pdeK*- mit pUT18-*dgcC*-Varianten waren durchgehend besser zu detektieren als pKT25-*dgcC* mit pUT18-*pdeK*. Grund hierfür mochte wie bereits beschrieben die Architektur der Fusionsproteine sein: während sich bei T25-PdeK die T25-Fusion nahe der Membran befand, ragte T18 bei PdeK-T18 weit ins Cytoplasma. Eine Interaktion mit membranständigen T25 der T25-DgcC-Fusionsproteine könnte demnach schwächer nachzuweisen sein. Die cytoplasmatische Domäne von DgcC ist bedeutend kürzer - 171 statt der 468 AS bei PdeK - und ein C-terminaler Tag dementsprechend näher an der Membran.

Ohne cytoplasmatischer Domäne ist die PdeK-Interaktion mit DgcC etwas stärker (Abb. 25, links: zweite Zeile). Die Deletion der cytoplasmatischen DgcC-Domäne auf pKT25 schwächt die Interaktion mit PdeK jedoch etwas ab (Abb. 25, rechts: dritte Zeile), ist jedoch in umgekehrter Kombination nicht reproduzierbar (Abb. 28, links: dritte Spalte). Die enzymatisch inaktive GGAAF-Variante zeigt in allen Kombinationen mit PdeK eine etwas schwächere Interaktion gegenüber der Wildtyp-Variante (Abb. 25, links: zweite Spalte; rechts: zweite Zeile). Eine Mutation des EAL-Motivs in PdeK (AAL) beeinträchtigt die Interaktion mit DgcC hingegen nicht (nicht abgebildet). Das Fehlen der periplasmatischen Domäne von PdeK unterbindet die Interaktion mit DgcC nicht vollständig, schwächt sie aber deutlich im Vergleich zur PdeK-Wildtypvariante (bzw. AAL-Mutante) oder dem Fusionsprotein ohne Cytoplasma-Domäne (Abb. 25, links: untere Reihe; rechts: letzte Spalte).

Dementsprechend kann der PdeK-Periplasma-Domäne eine Rolle bei der PdeK-DgcC-Interaktion zugesprochen werden. Cytoplasmatische Domänen beider Proteine oder ihre enzymatisch aktiven Zentren sind jedoch nicht maßgeblich an dieser Interaktion beteiligt. Vielmehr geschieht die Interaktion zwischen den Transmembran-Domänen,

ähnlich wie bei der Ausbildung von DgcC- bzw. PdeK-Dimeren und dem BcsA-BcsB-Komplex (Morgan et al, 2012; Omadjela et al, 2013).



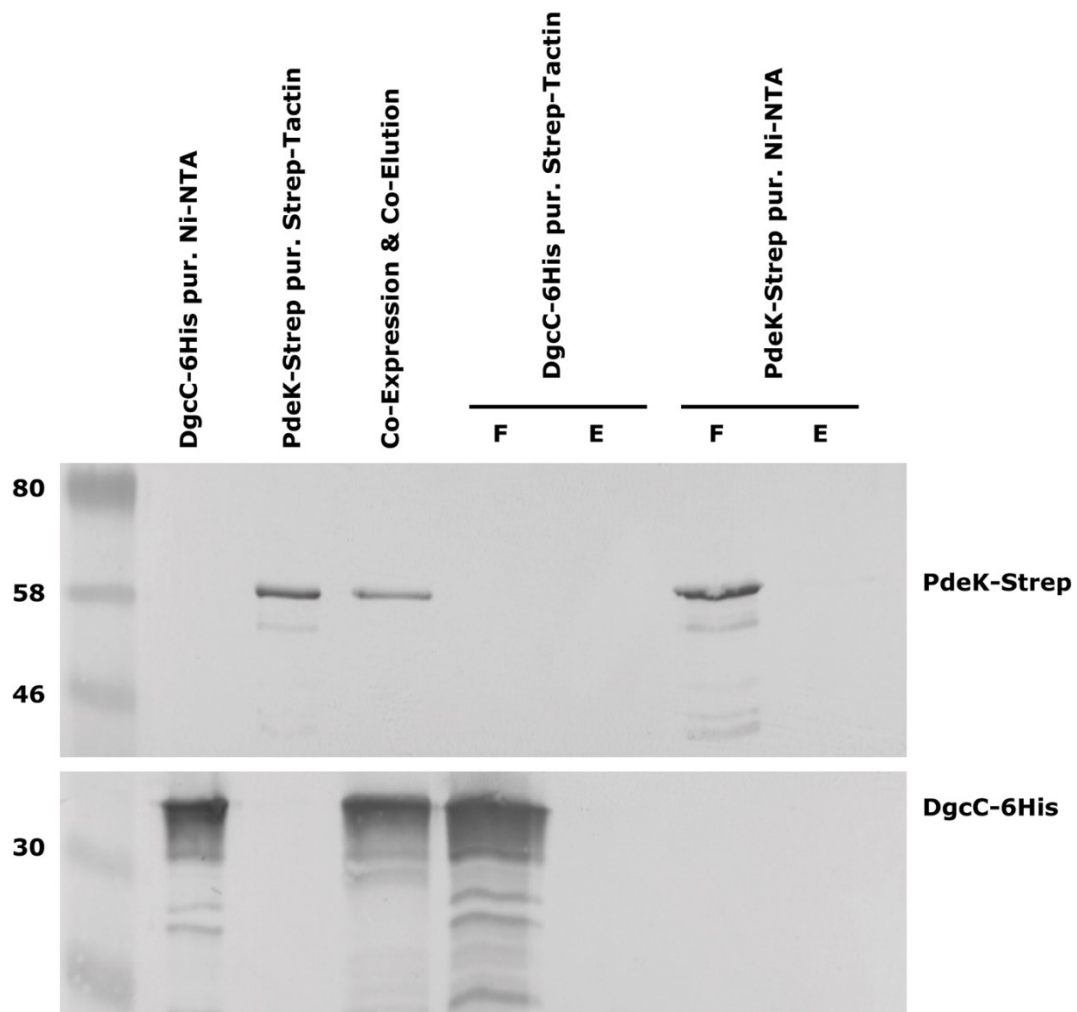
**Abb. 25. DgcC und PdeK interagieren innerhalb der inneren Membran.** *In-vivo* Protein-Interaktionsassay nach Karimova et al (1998; vgl. Abb. 21) mit verschiedenen Varianten von *dgcC* und *pdeK* auf pKT25 bzw. pUT18. WT – Wildtypprotein; GGAFF/AAL – enzymatische inaktives Protein (*dgcC*: DE291AA/ *pdeK*: EV431AA); Δ*cyt* – Deletion der cytoplasmatischen Domänen (*dgcC*: ΔAS201-372/*pdeK*: ΔAS181-649); Δ*peri* – Deletion der periplasmatischen Domäne (ΔAS26-136).

Die beschriebene DgcC-PdeK-Interaktion konnte darüber hinaus durch Co-Elution bestätigt werden (Abb. 26 3. Spur). DgcC-6xHis und PdeK-Strep wurden unter Nutzung beider MCSs in pETDEUT1-kloniert und in *E. coli* Rosetta co-exprimiert und in einem doppelten Pull-Down als Komplex isoliert. Die erste Aufreinigung erfolgte über den an PdeK fusionierten Strep-Tag. Das Eluat wurde anschließend mit Ni-NTA-Matrix inkubiert und über den DgcC-spezifischen His-Tag ein weiteres Mal gereinigt. Im Eluat ließen sich mit spezifischen Antikörpern PdeK-Strep (Abb. 26, oben) und DgcC-6xHis (Abb. 26, unten) nachweisen. Als Kontrollen dienten einzeln exprimierte und aufgereinigte Proteine (1. und 2. Spur). Auch eine Kreuzreaktion von PdeK-Strep mit Ni-NTA bzw. DgcC-6xHis mit Strep-Tactin-Sepharose konnte ausgeschlossen werden (4.-7. Spur). Auffällig war darüber hinaus, dass im Co-Elutions-Ansatz besonders für DgcC-6xHis weniger Abbaubanden nachgewiesen wurden. Auch wenn beide Proteine unabhängig voneinander überexprimiert, und erst die Zellpellets zur



Aufreinigung zusammengeführt wurden, konnten unter Verwendung einer Matrix beide Proteine co-eluiert werden (Daten nicht gezeigt).

Der hier isolierte DgcC-PdeK-Komplex ist demnach äußerst stabil und die Interaktion zwischen beiden Protein-Partnern hoch-spezifisch und hat möglicherweise stabilisierende Funktion gegenüber proteolytischen Abbau.



**Abb. 26. Co-Expression und Co-Elution von DgcC und PdeK.** Auf pETDuet1-kloniertes DgcC-6xHis und PdeK-Strep wurden in *E. coli* Rosetta co-exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über den PdeK-spezifischen Strep-Tag und im Anschluss über den DgcC-spezifischen 6xHis-Tag. Als Positiv-Kontrollen dienten von pAR15 exprimierte und über Ni-NTA aufgereinigtes DgcC-6xHis bzw. von pAR13 exprimierte und mittels Strep-Tactin Sepharose aufgereinigtes PdeK-Strep. Beide Proteine binden in Abwesenheit des Partners nicht an der jeweils anderen Matrix (DgcC-6xHis pur. Strep-Tactin bzw. PdeK-Strep pur. Ni-NTA; F – Durchfluss; E – Eluat). Detektion mit Strep- (oben) bzw. His-spezifischen Antikörpern (unten).

---

Basierend auf den in Kapitel 4.4. gewonnenen Daten kann nun die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die hohe Spezifität von DgcC und PdeK auf die Cellulose-Synthese durch Interaktion mit dem BcsA-BcsB-Komplex herrührt. Diese Interaktion wird durch die Co-Synthase, BcsB, vermittelt. Auch DgcC und PdeK interagieren unter- und miteinander. Ausgehend von den Studien verschiedener Protein-Varianten wurde deutlich, dass alle beobachteten Interaktionen hauptsächlich innerhalb der Membran und demzufolge zwischen den Transmembran-Domänen stattfinden.

#### **4.5. Molekulare Funktion von DgcC und PdeK bei der Cellulose-Regulation**

Die bisher gezeigten Daten machten deutlich, dass DgcC und PdeK neben DgcE-PdeH und DgcM-PdeR ein drittes c-di-GMP-Modul bilden, welches die Biofilm-Bildung in *E. coli* reguliert. Im Gegensatz zu diesen wirken DgcC und PdeK jedoch spezifisch auf Cellulose, ohne die Curli-Synthese entscheidend zu beeinflussen. Diese Spezifität kann durch Interaktion mit dem Synthese-Komplex innerhalb der inneren Zellmembran gewährleistet werden. Zudem sind beide Proteine *in vitro* enzymatisch aktiv und damit an Synthese bzw. Abbau von c-di-GMP beteiligt. Doch welche Rolle spielt diese Aktivität bei der Cellulose-Regulation? Ist die alleinige Interaktion mit BcsA-BcsB ausreichend für Aktivierung bzw. Reprimierung der Matrix-Synthese?

##### **4.5.1. DgcC-generiertes c-di-GMP aktiviert die Cellulose-Synthese**

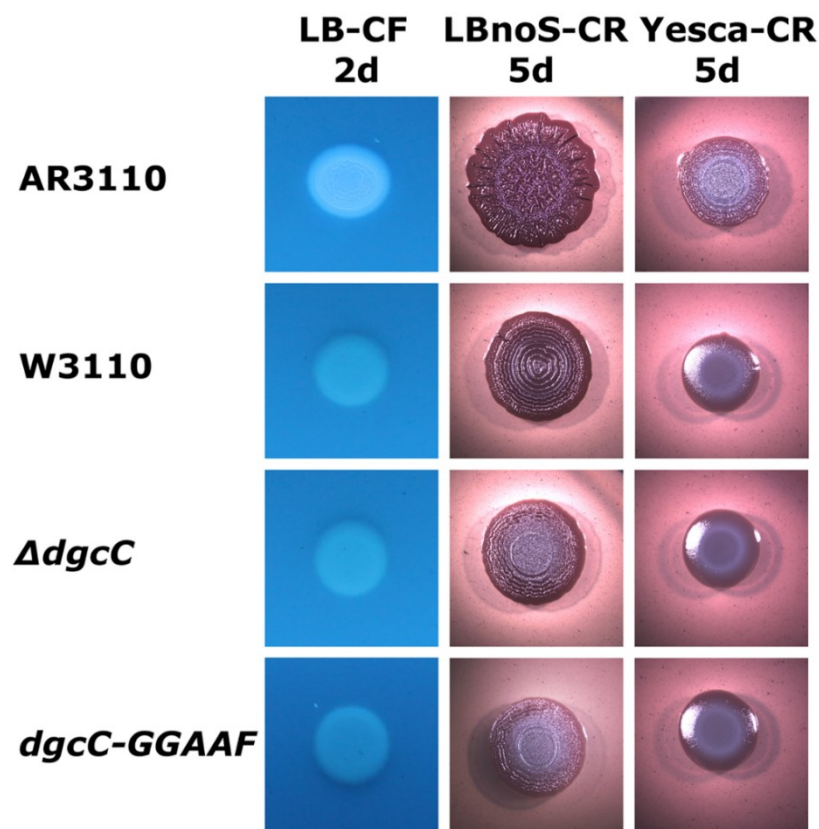
Auch DgcM und PdeR interagieren direkt mit ihrem Effektor MlrA. Gleichzeitig ist die enzymatische Aktivität von DgcM nicht zwingend erforderlich für die Funktion des Moduls (Lindenberg et al, 2013). Kann dies auch für DgcC und dessen Wirkung auf die Cellulose-Synthese gelten? Die Interaktion mit dem Synthese-Komplex ist unabhängig von der enzymatischen Aktivität.

Um zu untersuchen, ob die Interaktion mit BcsA-BcsB ausreichend für die Aktivierung der Cellulose-Synthese ist, wurden durch Zwei-Schritt-Mutagenese Punktmutationen ins bakterielle Chromosomen eingebracht, deren Folge ein *E. coli* AR3110 war, der für



ein an der A-Site mutiertes und damit enzymatisch inaktives DgcC kodiert (DgcC-GGAFF). Dieser wurde auf die Synthese von Matrixsubstanzen hingehend untersucht und mit einem vollständigen Gen-Knockout ( $\Delta dgcC$ ) verglichen. Anhand der schwachen Calcofluor-Bindung und der durch konzentrische Ringe unterbrochenen Oberfläche konnte die Synthese von Cellulose in beiden Stämmen ausgeschlossen werden (Abb. 27, linke & mittlere Spalte). Dennoch wiesen die Kolonien weitaus weniger Strukturen als W3110, dessen Biofilm-Bildung nur auf die Synthese von Curli Fimbrien zurückgeht und in diesem Stammhintergrund zusätzlich von DgcC stimuliert wird. Bei Inkubation auf Yesca-Medium zeigte AR3110 abgeschwächte Strukturen, die in den Cellulose-negativen Stämmen komplett abwesend waren (rechts).

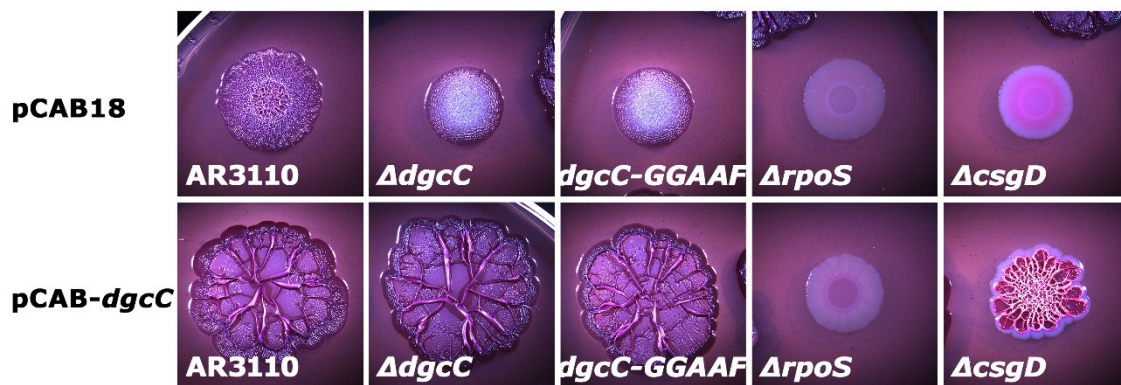
Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass DgcC durch die Synthese von c-di-GMP auf BcsA wirkt. Dies steht im Gegensatz zu DgcM, für dessen aktivierende Wirkung auf die *csgD*-Expression die enzymatische Aktivität nicht essentiell ist. Darüber hinaus konnte auch hier gezeigt werden, dass das von DgcC generierte c-di-GMP auch Einfluss auf die Curli-Synthese hat.



**Abb. 27. DgcC reguliert die Cellulose-Synthese positiv in Abhängigkeit seines GGDEF-Motivs.** AR3110-Makrokolonien im Wildtyphintergrund, nach Deletion von *dgcC* und mit mutierten GGDEF-Motiv im Chromosom (*dgcC-GGAAF*). Als Cellulose-negative Referenz diente W3110. Die Inkubation der Makrokolonien erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf Congo-Rot-Platten (mitte: LBnoS; rechts: Yesca-Medium) bzw. für zwei Tage auf LBnoS mit Calcofluor (links).

Der Cellulose-negative Phänotyp der GGAAF-Mutation konnte wie auch die Deletion des gesamten Gens mit Plasmid-kodiertem *dgcC* komplementiert werden (Abb. 28). Die Koloniemorphologie in Abhängigkeit von pCAB-*dgcC* war im WT-Hintergrund,  $\Delta dgcC$  und *dgcC-GGAAF* nicht nur stärker sondern grundlegend anders ausgeprägt als der AR3110-Wildtyp mit Leerplasmid pCAB18: die Kolonien nahmen mehr Fläche ein, bildeten hohe, radial verlaufende Stege und zeigten einen dunkel angefärbten Kolonierand. Plasmid-kodiertes *dgcC* lag hier zum einen in mehreren Gen-Kopien vor, wurde stärker exprimiert als die chromosomale Kopie und unterlag nicht mehr der Kontrolle von RpoS und CsgD. Die c-di-GMP-Synthese war dementsprechend nicht mehr an die stationäre Wachstumsphase gebunden. Erhöhte c-di-GMP-Spiegel im WT,  $\Delta dgcC$  und *dgcC-GGAAF* stimulieren die *csgD*-Expression und damit die Curli-Synthese auch in den Randregionen und den unteren Kolonie-Schichten (Serra et al, 2015), während die Expression der Cellulose-Synthase zusätzlich der Regulation durch RpoS unterliegt. Dass in diesen Randregionen Curli-Fimbrien und keine Cellulose gebildet wurde konnte aus der Kolonie-Morphologie von  $\Delta csgD$  + pCAB-*dgcC* geschlossen werden: Cellulose-Synthese beschränkte sich auf das Zentrum der Kolonie, während die Randbereiche nicht durch Congo-Rot angefärbt wurden.

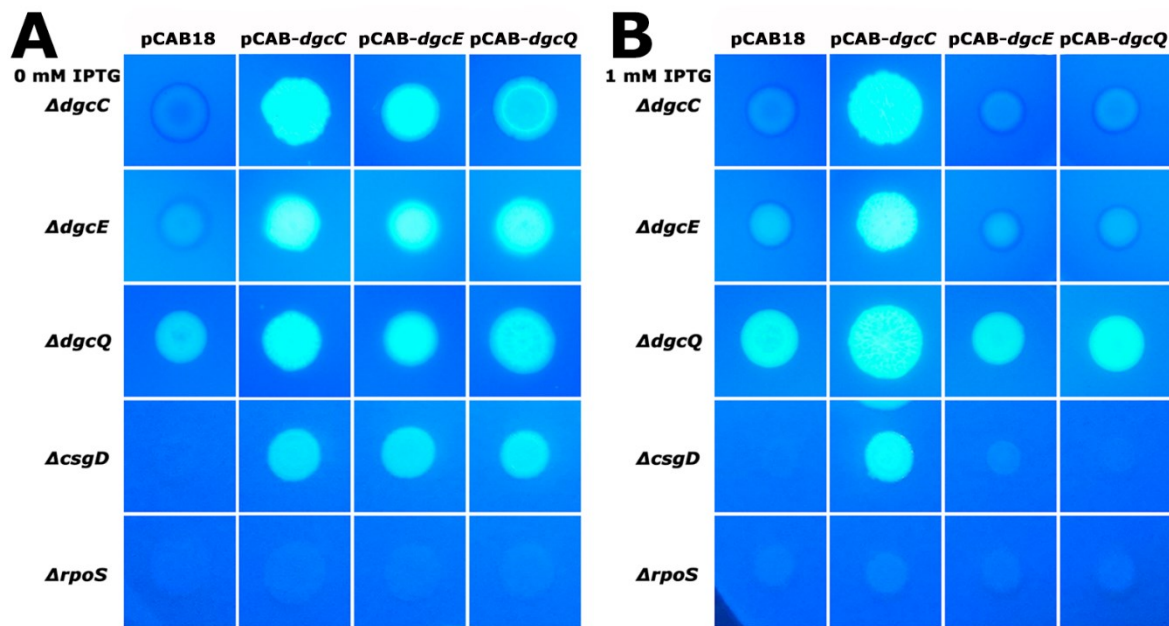
Der Cellulose-und Curli-negative Phänotyp einer  $\Delta rpoS$ -Mutation konnte mit erhöhten Mengen c-di-GMP nicht komplementiert werden, da sowohl *csgBAC* als auch das Cellulose-Operon vom alternativen Sigmafaktor abhängig bzw. aktiviert sind. Gleichzeitig zeigte sich, dass die in Abbildung 9 dokumentierte Basalexpression des *bcs*-Operons im  $\Delta rpoS$ -Hintergrund unabhängig vom c-di-GMP-Spiegel nicht ausreichend zur Synthese von Cellulose war, oder aber ein weiterer zur Cellulose-Synthese nötiger Faktor der Kontrolle von RpoS, nicht aber der von CsgD unterlag.



**Abb. 28. Komplementierung von Cellulose-negativer *dgcC*-Mutation und *dgcC*-GGAAF-Variante.** Plasmid-kodiertes *dgcC* (pCAB-*dgcC*) kann den Cellulose-negativen Phänotypen von *dgcC*-bzw. *csgD*-Mutanten und der *dgcC*-GGAAF-Variante komplementieren, nicht aber eine *rpoS*-Deletion. Die Inkubation der Makrokolonien erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf LBnoS mit Congo-Rot und Ampicillin.

Neben *dgcC* selbst konnte auch die Plasmid-kodierte Expression anderer DGCs den Cellulose-negativen Phänotypen aufheben (Abb. 29), selbst wenn die Deletion dieser DGCs keinen spezifischen Einfluss auf die Cellulose-Synthese im Wildtyp-Hintergrund hatte (vgl. Abb. 13 & 14). Im zur Komplementierung genutzten pCAB-18 unterlagen *dgcC*, *dgcE* bzw. *dgcQ* der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *taq*-Promotors. Die Repression durch LacI ist schwach, es kam auch ohne IPTG-Zugabe zur Expression (Abb. 29A). Diese war ausreichend, um *dgcC*-und *csgD*-Mutationen hinsichtlich ihrer Calcofluor-Bindung zu komplementieren. Bei Induktion mit 1 mM IPTG hingegen vermochte nur Plasmid-kodiertes DgcC den Cellulose-negativen Phänotypen zu komplementieren, nicht aber die Expression von *dgcE* oder *dgcQ* (Abb. 29B). Kolonien mit durch IPTG-induzierten *dgcE*- bzw. *dgcQ*-Plasmiden zeigten die gleiche Calcofluor-Bindung, wie die entsprechenden Kolonien mit Leerplasmid. DgcE und DgcQ sind Teil des c-di-GMP-Moduls, welches über DgcM-PdeR CsgD reguliert (Abb. 2). Eine durch CsgD stimulierte Expression von Komponenten, die der Cellulose-Synthese entgegenwirken, kann jedoch ausgeschlossen werden, da diese Beobachtung auch im  $\Delta csgD$ -Hintergrund gemacht wurde. Als mögliche Ursachen dafür sind bei verstärkter Expression durch IPTG-Induktion der Abbau von *dgcE*/*dgcQ*-mRNA oder der Proteine selbst bzw. die Aggregation zu inaktiven Multimeren denkbar, die jedoch auch für pCAB-*dgcC* nicht ausgeschlossen werden konnte. Gleichzeitig berichten auch

(Ryjenkov et al, 2005) von Problemen bei der Überexpression einiger DGCs, die sie mit der möglichen Toxizität hoher c-di-GMP-Konzentrationen begründen. Möglich ist jedoch, dass die Interaktion mit PdeK bzw. BcsA-BcsB DgcC stabilisiert (vgl. Abb. 26). Insgesamt zeigten diese Daten, dass DgcC zwar durch Interaktion mit BcsA-BcsB spezifisch auf die Cellulose-Synthese wirkt, der Interaktion *per se* jedoch keine regulatorische Funktion innewohnt. Vielmehr ist zu vermuten, dass durch Co-Lokalisation mit der DGC hohe Mengen c-di-GMP in unmittelbarer Umgebung zur Cellulose-Synthase BcsA generiert werden. Bei Expression Plasmid-kodierter DGCs und dadurch erhöhter c-di-GMP-Konzentrationen konnte der Cellulose-negative Phänotyp einer *dgcC*-Deletion komplementiert werden.



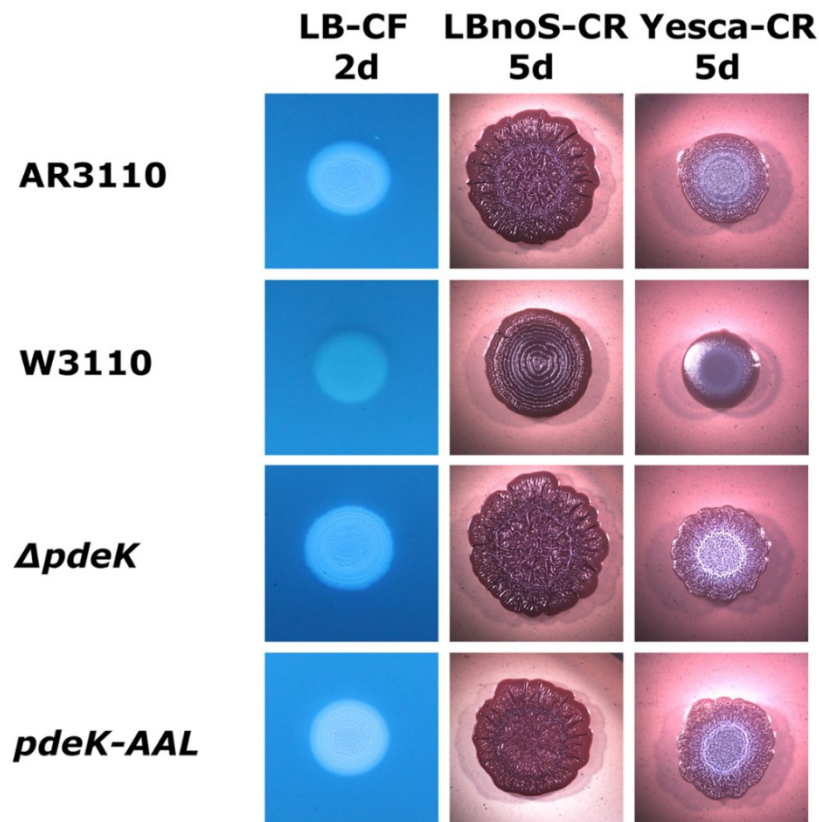
**Abb. 29. *dgcC*-Mutationen können durch Plasmid-kodierte DGCs komplementiert werden.** A) un- induzierte *dgcE*- und *dgcQ*-Plasmide können den Cellulose-negativen Phänotypen von *ΔdgcC* und *ΔcsgD* komplementieren, nicht aber jedoch nach Induktion mit 1 mM IPTG (B). Ähnlich verhält es sich mit den Cellulose-reduzierten *ΔdgcE*- bzw. *ΔdgcQ*-Mutationen. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 28°C auf LBnoS mit Calcofluor, Ampicillin und 1 mM IPTG (nur B). Cellulose-positive Kolonien binden den fluoreszierenden Farbstoff und erscheinen heller.

#### 4.5.2. Das GGDEF-EAL-Domänen-Protein PdeK inhibiert die Cellulose-Synthese

Ausgehend von den bisher beschriebenen c-di-GMP-Modulen kann die PDE auf unterschiedliche Wege regulatorisch auf DGC und Effektor wirken: i.) durch seine enzymatische Aktivität wird c-di-GMP abgebaut und steht dem Effektor nicht mehr zur Verfügung (DgcE-PdeH) oder ii.) aufgrund steigender Konzentrationen von c-di-GMP beginnt die PDE, dieses abzubauen und entlässt gleichzeitig Effektor (und DGC) aus einer zuvor inhibierenden Interaktion (DgcM-PdeR). Im zweiten erläuterten Mechanismus agiert die PDE als Trigger-Enzym und inhibiert in Abhängig von c-di-GMP den DGC-Effektor-Komplex durch Interaktion. Ist die PDE enzymatisch inaktiv, d.h. ihr EAL-Motiv zu AAL mutiert, wird sie „blind“ gegenüber c-di-GMP und wirkt als Hyper-Inhibitor (Lindenberg et al, 2013). Ausgehend von den bisher dargestellten Ergebnissen – PdeK interagiert mit DgcC & BcsA-BcsB und ist enzymatisch aktiv – ergab sich die Frage, ob auch PdeK als Trigger-Enzym wirkt.

Um zwischen den genannten Wirkmechanismen zu differenzieren wurden durch Zwei-Schritt-Mutagenese die Nukleotid-Codons mutiert, die im *pdeK*-Leserahmen für das EVL-Motiv kodieren (*pdeK*-AAL). Sollte PdeK als Trigger-Enzym agieren, wäre ein Cellulose-reduzierter oder -negativer Phänotypen zu erwarten. Deutet die Oberflächenstruktur auf verstärkte Cellulose-Synthese hin, wirkt PdeK aufgrund seiner Enzymaktivität und nicht durch hemmende Interaktionen. Die *pdeK*-AAL-Variante zeigte den gleichen Phänotypen wie die Deletionsmutante: Calcofluor-Bindung und Oberflächenstruktur der Kolonie waren im Vergleich zum Wildtyp AR3110 intensiver (Abb. 30). Da komplexere Morphologien bei Inkubation auf LBnoS häufig nur schwer erkennbar waren, konnte Yesca-Medium bevorzugt zur Analyse von Mutanten wie *ΔpdeK* genutzt werden, die stärker strukturierte Biofilme bildeten als der Wildtyp AR3110 (Abb. 30, linke Spalte).





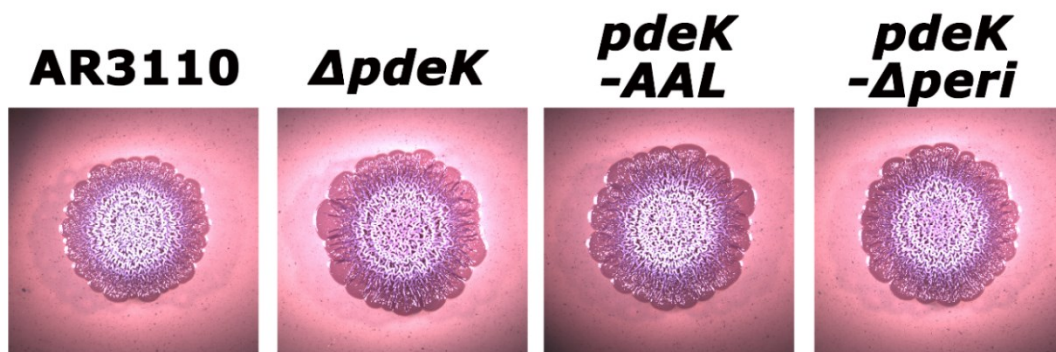
**Abb. 30. PdeK reguliert die Cellulose-Synthese negativ in Abhängigkeit seines EAL-Motivs.** AR3110-Makrokolonien im Wildtyp-Hintergrund, nach Deletion von *pdeK* und mit mutierten EAL-Motiv im Chromosom (*pdeK-AAL*). Als Cellulose-negative Referenz dient W3110. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf Congo-Rot-Platten (mitte: LBnoS; rechts: Yesca-Medium) bzw. für zwei Tage auf LBnoS mit Calcofluor (links)(vgl. Abb. 27).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass PdeK nicht als bifunktionales Trigger-Enzym auf die Cellulose-Synthese wirkt. Vielmehr inhibiert PdeK die Synthese des Exopolysaccharids durch Abbau von c-di-GMP.

Laut Aminosäuresequenz verfügt PdeK über eine etwa 120 AS lange periplasmatische Sensordomäne (Abb. 16). Auch einige Komponenten des Cellulose-Synthese-Komplexes haben Periplasma-Domänen oder sind gänzlich in diesem Bereich der Zelle lokalisiert (Abb. 3C). Denkbar ist somit, dass die PdeK-Periplasma-Domäne eine regulatorische Funktion bei der Cellulose-Synthese hat, die auf Interaktion mit Bcs-Komponenten oder der Sensorik periplasmatischer Reize beruhen könnte. Welche Auswirkungen hätte ein Fehlen dieser Domäne auf die Cellulose-Synthese in Makrokolonie-Biofilmen?

Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden durch Zwei-Schritt-Mutagenese die Nukleotid-Triplets 26-136 im *pdeK*-Leserahmen von AR3110 deletiert. Folge dessen ist ein verkürztes PdeK, welches statt der periplasmatischen GAPES-Domäne nur noch 10 AS vorweist, die von Transmembran-Domänen flankiert werden (vgl. auch PdeK- $\Delta$ *peri* Kapitel 4.4). Der Vergleich von Makrokolonien dieses *pdeK*-Derivates (*pdeK*- $\Delta$ *peri*) mit dem Wildtyp AR3110, der *pdeK*-Deletionsmutante und der AAL-Mutante zeigte einen intermediären Phänotypen (Abb. 31). Im Gegensatz zum AR3110 war die Koloniemorphologie auf Yesca-Medium besonders im Randbereich etwas ausgeprägter, jedoch nicht vergleichbar mit  $\Delta$ *pdeK* oder *pdeK*-AAL.

Die Periplasma-Domäne von PdeK hat demnach Anteil an der negativen Regulation der Cellulose-Synthese, ist aber nicht essentiell. Ob dies durch die Funktion als Sensordomäne oder ausschließlich durch die bereits dokumentierte Interaktion mit DgcC und BcsB oder weiteren Komponenten des Synthese-Apparats geschieht, kann hier nicht abschließend geklärt werden.



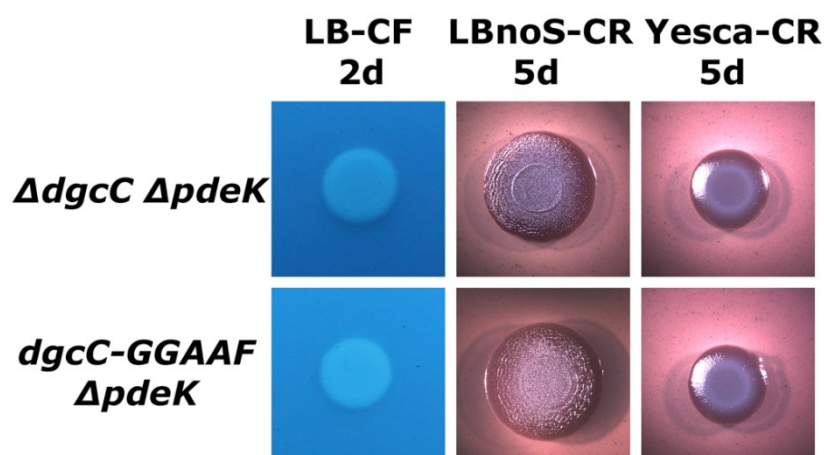
**Abb. 31. Die chromosomale Deletion der periplasmatischen Domäne von PdeK und deren Einfluss auf die Koloniemorphologie.** *pdeK*- $\Delta$ *peri* stellt eine Deletion der Nukleotide im *pdeK*-Leserahmen von AR3110 dar, die für die AS 26-136 kodieren, während als Kontrollen AR3110,  $\Delta$ *pdeK* und *pdeK*-AAL genutzt wurden (vgl. Abb. 30). Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf Congo-Rot-Platten (Yesca-Medium).

#### 4.5.3. PdeK wirkt als Antagonist zu DgcC auf die Cellulose-Synthese

DgcC hat aufgrund seiner DGC-Aktivität einen stimulierenden Einfluss auf die Cellulose-Synthese, während PdeK diese inhibiert. Wie aber verhält es sich, wenn

sowohl DgcC als auch PdeK abwesend sind? Kann die Deletion von *pdeK* den Cellulose-negativen Phänotypen von  $\Delta dgcC$  oder *dgcC*-GGAAF komplementieren? Wird durch gleichzeitige Deletion von *dgcC* und *pdeK* der Cellulose-Komplex „blind“ für eine c-di-GMP-abhängige Regulation, wie es auch im DgcM-PdeR-MlrA-Modul beobachtet wurde (Lindenberg et al, 2013)? Oder fällt die regulatorische Rolle anderen DGCs und PDEs zu?

Makrokolonie-Struktur und Calcofluor-Bindung einer *dgcC*-*pdeK*-Doppelmutante (bzw. eine *dgcC*-GGAAF- $\Delta pdeK$ -Mutante) machten deutlich, dass das Fehlen von DgcC (bzw. dessen Inaktivität) nicht durch gleichzeitige Deletion des Inhibitors komplementiert werden kann. Die Kolonien zeigten bei Inkubation auf Congo-Rot- bzw. Calcofluor-Platten vergleichbare Phänotypen wie eine *dgcC*-Einzelmutante (*dgcC*-*pdeK*<sup>+</sup>)(vgl. Abb. 27).



**Abb. 32. Der Cellulose-negative Phänotyp von  $\Delta dgcC$  kann nicht durch Deletion von *pdeK* aufgehoben werden.** *pdeK*-Deletion im AR3110-Hintergrund mit deletiertem *dgcC* bzw. mutiertem *dgcC*-GGAAF. Die Makrokolonien entstammen der gleichen Serie wie die in Abb. 27 & 30 gezeigten. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf Congo-Rot-Platten (mitte: LBnoS; rechts: Yesca-Medium) bzw. für zwei Tage auf LBnoS mit Calcofluor (links).

PdeK wirkt dementsprechend über DgcC inhibierend auf die Cellulose-Synthese: Das von DgcC generierte c-di-GMP wird entweder i.) von BcsA gebunden und aktiviert so dessen GT-Aktivität und/oder ii.) von PdeK abgebaut. Liegt DgcC nur in inaktiver Form vor, stimuliert es die Cellulose-Synthese auch in Abwesenheit von PdeK nicht.



#### 4.6. Weitere regulatorische Faktoren der Cellulose-Synthese-Maschinerie

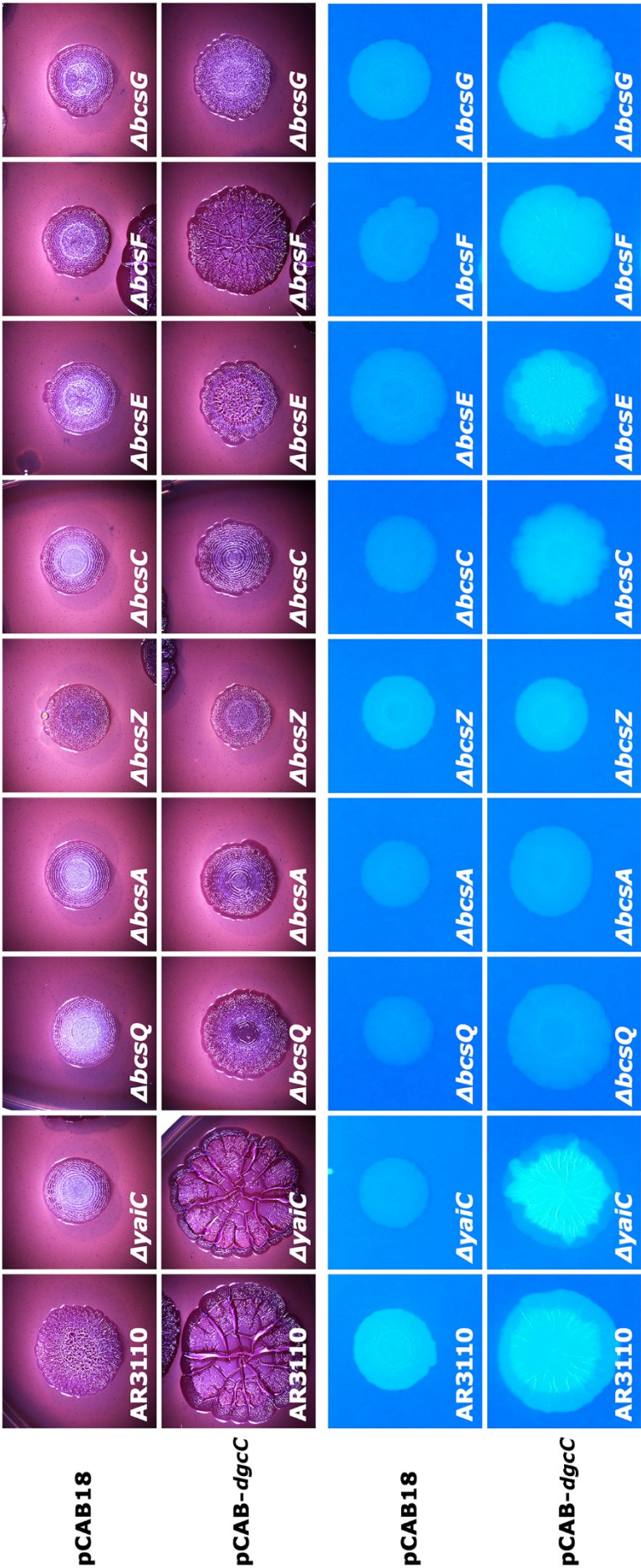
Neben dem Synthese-Komplex BcsA-BcsB kodiert der *yhjR-bcsQABZC* für weitere Komponenten des Cellulose-Synthese-Apparats, die an Synthese und Export des Exopolysaccharids beteiligt sind (vgl. Kapitel 1.3). Die Funktion des zweiten Operons, *bcsEFG*, ist bisher unbekannt, seine Genprodukte aber erforderlich für die maximale Cellulose-Synthese in *E. coli* und *Salmonella* (Solano et al, 2002; Zogaj et al, 2001). So bindet BcsE an einer I-Site-ähnlichen Stelle c-di-GMP (Fang et al, 2014). Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass neben BcsA auch andere Bcs-Komponenten als c-di-GMP-Effektor dienen und regulatorisch in die Cellulose-Synthese eingreifen. Im Folgenden sollte untersucht werden, wie die Deletion verschiedener *bcs*-Gene die Struktur der Makrokolonie moduliert. Zusätzlich wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte auf die Cellulose-Synthese durch erhöhte Mengen c-di-GMP (durch Plasmid-kodiertes DgcC) beeinflusst werden.

Der Cellulose-negative Phänotyp einer  $\Delta bcsQ$ - bzw.  $\Delta bcsA$ -Deletion konnte auch durch erhöhte c-di-GMP-Konzentrationen nicht komplementiert werden (Abb. 33). Durch *dgcC*-Expression hervorgerufene Änderungen in der Makrokolonie, die jedoch nicht mit veränderter Calcofluor-Bindung einhergingen, können auf verstärkte Curli-Synthese zurückgeführt werden.  $\Delta bcsZ$  reduzierte Kolonie-Morphologie und Calcofluor-Bindung auf c-di-GMP-unabhängigen Weg. Auch  $\Delta bcsC$  zeigte einen Cellulose-negativen Phänotyp, während die Calcofluor-Bindung bei *dgcC*-Expression leicht zunahm. BcsC gewährleistet den Export durch die äußere Zellmembran, der in der  $\Delta bcsC$ -Mutante demnach nur durch andere Porine geschehen kann. Effekte auf die Curli-Synthese verstärkten die Calcofluor-Bindung vermutlich zusätzlich. Die Deletionsmutanten  $\Delta bcsE$ ,  $\Delta bcsF$  und  $\Delta bcsG$  zeigen verminderte Oberflächenstrukturen, die wie bei  $\Delta bcsA$  auf das Fehlen von Cellulose zurückzuführen sind. Durch erhöhte zelluläre c-di-GMP-Spiegel kann dieser Phänotyp teilweise komplementiert werden. Die Kolonien binden bei Expression von *dgcC* wieder Calcofluor, wobei jedoch nur die Kolonie-Morphologie der  $\Delta bcsE$ - und  $\Delta bcsG$ -Mutanten mit dem Wildtyp (+ Leerplasmid) vergleichbar sind.  $\Delta bcsF$  + pCAB-*dgcC* bildet größere, teilweise flache Kolonien aus.

---

Für alle Gene des *bcs*-Lokus konnte somit bestätigt werden, dass sie essentiell für die maximale Synthese von Cellulose im Biofilm sind (*bcsB* und *yhjR* waren nicht Teil der Studie). Während das *bcsQABZC*-Operon für strukturelle Komponenten des Synthesekomplexes kodiert, übernehmen die Genprodukte des *bcsEFG*-Operons eine regulatorische Funktion. Die Deletion dieser Gene verhindert die Synthese von Cellulose, wobei dies im Fall von  $\Delta bcsE$ ,  $\Delta bcsF$  und  $\Delta bcsG$  durch künstlich erhöhte Mengen c-di-GMPs umgangen werden kann. Zusätzlich konnte erstmals gezeigt werden, dass BcsE, BcsF und BcsG distinkte Funktionen bei dieser Regulation innehaben. Zwar sind Phänotypen der einzelnen Mutanten ähnlich und vergleichbar mit der Deletion des gesamten Operons (vgl Fig. 1C in Serra et al, 2013a), die Koloniemorphologie variiert jedoch stark bei erhöhten c-di-GMP-Konzentrationen.

**Abb. 33. Komplementierung Cellulose-negativer bzw. reduzierter *bcs*-Mutationen mit pCAB-*dgcC*.** Erhöhte Mengen c-di-GMP vermittelt durch Plasmid-kodiertes *dgcC* (pCAB-*dgcC*) kann den Cellulose-reduzierten Phänotypen einiger *bcs*-Mutanten komplementieren, während *bcsQ* und *bcsA* für die Cellulose-Synthese essentiell sind. Die Inkubation der Makrokolonien erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf LBnoS mit Congo-Rot und Ampicillin bzw. für zwei Tage auf LBnoS mit Calcofluor und Ampicillin. Abbildung auf der nachfolgenden Seite.



---

#### **4.7. Untersuchungen zur Biofilmbildung des *E. coli* O104:H4-Ausbruchstammes 2011**

Im Sommer 2011 führte ein Ausbruch enterohämorrhagischer *E. coli* O104:H4 zu fast 4000 Infizierten, von denen 20% eine hämolytisch-urämisches Syndrom entwickelten und durch deren Folgen 53 Patienten starben (Bielaszewska et al, 2011; Mellmann et al, 2011; Muniesa et al, 2012). Der Ausbruchstamm zeichnet sich durch EAEC-ähnliche Biofilmbildung aus und synthetisiert Shiga-Toxin, welches durch Gewebeschäden in die Blutbahn gelangt und die Ausbildung von HUS stimuliert. Gleichzeitig war zu diesem Zeitpunkt bekannt, dass Curli Fimbrien proinflammatorisch auf wirken und die Interleukin-8 Synthese im Wirt stimulieren (Bian et al, 2000; Tükel et al, 2010; Tükel et al, 2009). Sofern Curli Fimbrien nicht in einem Netz aus Cellulose-Polymeren eingewoben sind, sondern „nackt“ auf der Biofilmoberfläche vorliegen, verstärkt sich diese proinflammatorische Wirkung noch (Wang et al, 2006).

Der Fokus der AG Hengge liegt auf der c-di-GMP-abhängigen Signaltransduktion, sowie der damit verbundenen Curli- und Cellulose-Synthese, die im Rahmen pathogener *E. coli* bisher wenig untersucht wurde. Unser „mikrobiologischer“ Blickwinkel veranlasste uns dazu, folgende Fragestellung aufzuwerfen: Kann eine verstärkte Curli-Synthese im Wirt zur erhöhten Virulenz des O104:H4 beitragen?

##### **4.7.1. GGDEF-/EAL-kodierende Gene von O104:H4 und verwandten EAEC**

In Kooperation mit Prof. Dr. Lothar H. Wieler (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin; seit 2015 Präsident am RKI Berlin) und Ph. D. Tatyana L. Povolotsky wurden zwei Derivate des O104:H4-Ausbruchstamms und andere pathogene *E. coli* hinsichtlich ihrer c-di-GMP-abhängigen Biofilmbildung bioinformatisch und mikrobiologisch untersucht und mit einem klassischen kommensalen *E. coli* K-12 verglichen (Richter et al, 2014).

*In silico* Analysen von T. L. Povolotsky zeigten, dass Genome des *E. coli* O104:H4 Ausbruchstamms und verwandter EAEC-Linien für eine zusätzliche und gleichzeitig stark exprimierte DGC kodieren (DgcX) und eine *dgcF*-Variante (*yneF*) aufweisen, die

in *E. coli* K-12 so nicht vorhanden ist. In *E. coli* K-12 wird *dgcF* nicht exprimiert (Sommerfeldt et al, 2009). Darüber hinaus ist der Promotorbereich von *pdeL* (*yahA*) durch den ORF eines Adhesin-spezifischen Autotransporters unterbrochen, was vermutlich die Expression des Gens stark einschränkt, wenn nicht sogar unterbindet (zusammengefasst in Povolotsky, PhD Thesis und Richter et al, 2014). Diese genetischen Variationen lassen ein erhöhtes Potential zur Akkumulation von c-di-GMP vermuten, dessen mögliche Auswirkungen auf die Biofilmbildung im Folgenden untersucht wurden.

#### **4.7.2. Humanpathogene *E. coli* unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Matrixsubstanzen**

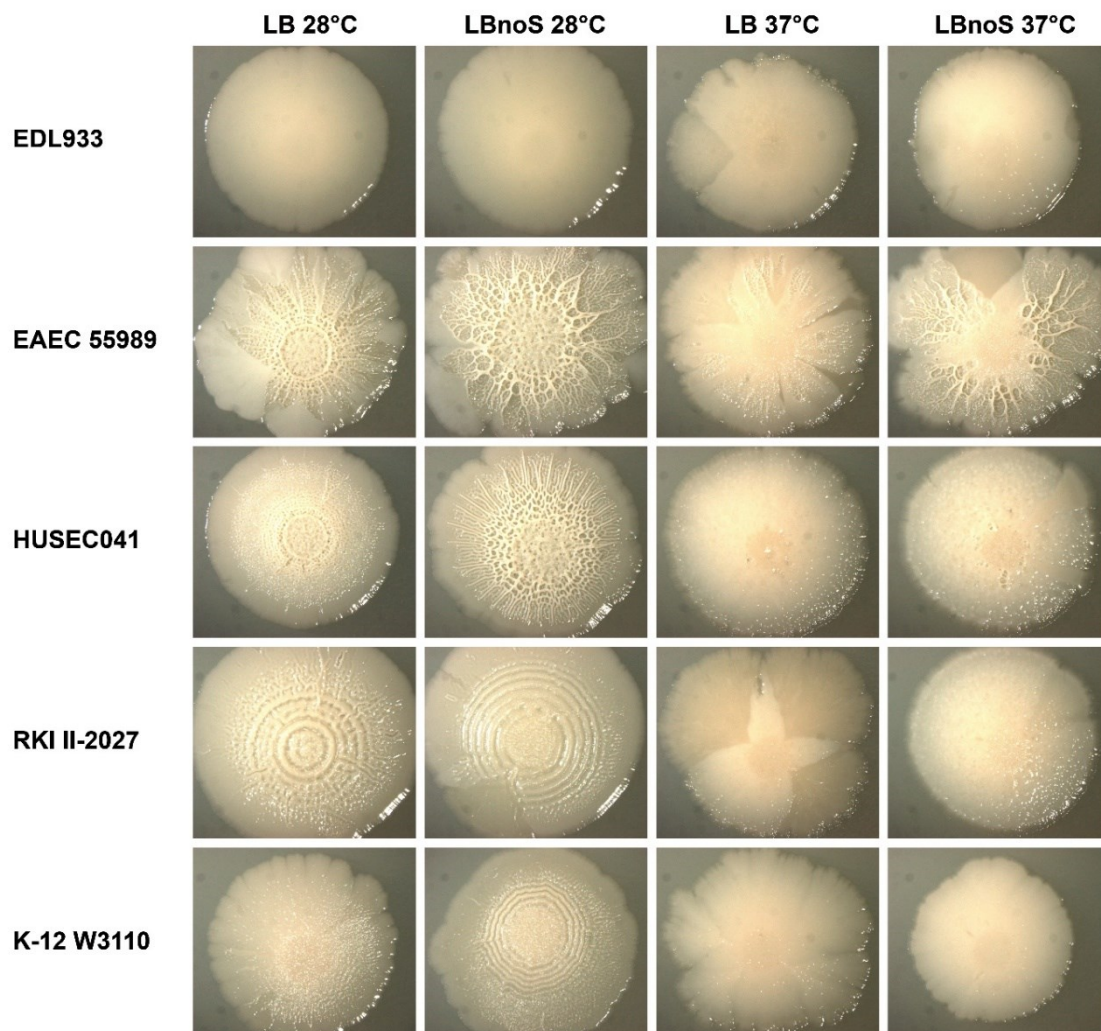
Neben ausgeschütteten Toxinen können auch extrazelluläre Matrixkomponenten in Biofilmen als Virulenzfaktoren wirken und die Immunantwort des Wirts stimulieren. Die Synthese von Matrixsubstanzen der verschiedenen *E. coli*-Stämme wurde anhand von Makrokolonie-Biofilmen untersucht, die auf LB und LBnoS bei 28°C und 37°C für fünf bis sieben Tage inkubiert wurden. Die Analyse von Kolonie-Oberfläche und Bindung verschiedener Indikator-Farbstoffe (Congo-Rot, Calcofluor) lässt Schlussfolgerungen über das Vorhandensein von Curli-Fimbrien oder Cellulose im Biofilm zu (Abb. 34 & 35).

Im Folgenden wurden zwei Derivate des O104:H4-Ausbruchstammes in den Analysen betrachtet: RKI II-2027 ist vom Robert-Koch-Institut als offizieller Ausbruchsstamm deklariert, während LB226692 das erste vollständig sequenzierte Isolat darstellt (Mellmann et al, 2011)(ausgenommen Abb. 34). Der Ausbruchsstamm zeigte ringförmige Oberflächenstrukturen nach Inkubation bei 28°C, die auch im K-12-Referenzstamm W3110 zu beobachten waren und auf die Synthese von Curli-Fimbrien in Abwesenheit von Cellulose schließen lassen (vgl. Kapitel 4.1). Bei 37°C erschienen die Kolonien hingegen flach und strukturlos.

In unseren Analysen wurden zwei EAEC O104:H4-Vertreter berücksichtigt, da sowohl Sequenzanalysen als auch die Kombination der gebildeten Virulenzfaktoren einen genetischen Ursprung des Ausbruchstamms im Bereich der EAEC zeigen. Der



enteroaggregative 55989 wurde in den späten 1990ern von einem HIV-positiven Patienten in Zentralafrika isoliert (Mossoro et al, 2002; Touchon et al, 2009), während HUSEC041 als Teil der HUS-assoziierten EHEC-Stammsammlung 2001 in Deutschland isoliert wurde (Mellmann et al, 2008). EAEC 55989 wies eine Temperatur-unabhängige Ausbildung netzartiger Strukturen auf, für die Synthese von Curli Fimbrien und Cellulose sowohl bei 28°C als auch bei 37°C sprechen. Ähnlich verhielt sich HUSEC041, wobei entsprechende Oberflächenstrukturen nur bei 28°C auftraten und die Kolonien bei 37° schleimig und flach erschienen.

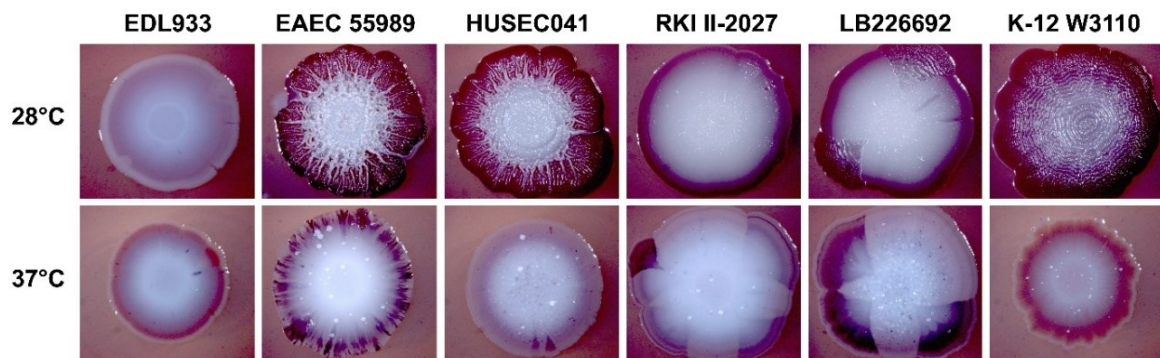


**Abb. 34. Makrokolonie-Morphologie pathogener *E. coli* im Vergleich zum kommensalen *E. coli* K-12 W3110.** 5 µl von Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme wurden auf LB bzw. LBnoS getropft und für sieben Tage bei 28°C bzw. 37°C inkubiert. Komplexe Oberflächenstrukturen der entstandenen Makrokolonien lassen auf die Synthese verschiedener extrazellulärer Matrixsubstanzen im Biofilm schließen.

---

Neben einer EAEC-typischen Adhärenz an Epithelzellen bildet der Ausbruchsstamm Shiga-Toxin, wie es typisch für EHECs ist. Aufgrund dessen wurde als klassischer Vertreter von EHEC O157:H7-Linien *E. coli* EDL933 ausgewählt, welcher zwei Prophagen im Genom trägt, die für Gene zur Produktion von Shiga-Toxin 1 und 2 kodieren. Einer dieser Prophagen, BP-933W, ist im ORF von *mlrA* integriert (Serra-Moreno et al, 2007), einem zur *csgD*-Expression essentiellen Transkriptionsregulator (Brown et al, 2001)(vgl. Abb. 2). Die Integration in *mlrA* bestätigt sich Kolonie-Phänotyp von EDL933: auch nach mehrtägiger Inkubation erschienen die Kolonien sowohl bei 28°C als auch bei 37°C schleimig und flach, ohne jegliche Struktur oder der Fähigkeit, Congo-Rot zu binden (Abb. 34 & 35).

Komplexe Biofilmstrukturen konnten auch bei Inkubation auf Congo-Rot-Platten beobachtet werden (Abb. 35) und ließen hinsichtlich der Bildung von Matrixsubstanzen die gleichen Schlussfolgerungen zu. Während EDL933 bei keiner der untersuchten Inkubationsbedingungen Matrixsubstanzen synthetisierte, zeigten alle anderen Stämme teilweise sehr komplexe Oberflächenstrukturen bei 28°C. Zusätzlich fiel auf, dass beide Derivate des Ausbruchstamms besonders bei 37°C Sektoren ausbildeten, die unterschiedlich stark durch Congo-Rot angefärbt wurden. Auch bei Inkubation ohne Congo-Rot war diese Sektoren-Bildung bereits erkennbar und wird in Abschnitt 4.7.4. genauer diskutiert. Gleiches konnte auch bei 55989 und HUSEC041 beobachtet werden, wenn auch in weitaus geringerem Maße. Zusätzlich war bei Temperaturen von 28°C beim Ausbruchsstamm ein zäher, nicht durch Congo-Rot anfärbbarer Bereich erkennbar, der auch bei 55989 und HUSEC041 zu finden war und möglicherweise eine weitere Matrixkomponente darstellt. Bei 37°C wurden CsgD-abhängige Matrixbestandteile wie Curli und Cellulose vom W3110 nicht synthetisiert. Dennoch erschien die Kolonie rötlich, was möglicherweise auf die Produktion von PGA zurückzuführen war. Auch dieses Exopolysaccharid bindet Congo-Rot (Izano et al, 2008) und lies die W3110- und EDL933-Kolonien bei 37°C rötlich bis braun erscheinen.

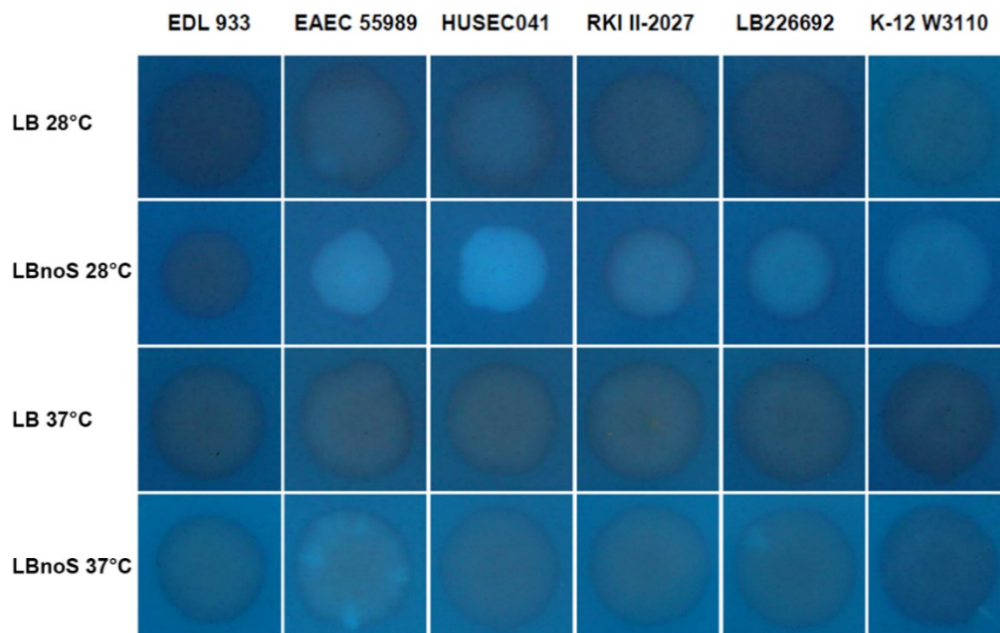


**Abb. 35. Pathogene *E. coli* zeigen Temperatur- und Stamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Congo-Rot-Bindung.** 5  $\mu$ l von Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme wurden auf LBnoS mit Congo-Rot getropft und für sieben Tage bei 28°C bzw. 37°C inkubiert.

#### 4.7.3. *E. coli* O104:H4 produziert keine Cellulose

Die Ausbildung netzartiger Oberflächenstrukturen in Makrokolonien von 55989 und HUSEC041 lassen neben amyloiden Curli-Fimbrien auf das Vorhandensein von Cellulose im Biofilm schließen. Zur genaueren Detektion des Polysaccharides wurden alle Stämme für drei Tage auf Calcofluor-haltigen Platten inkubiert und anschließende Bindung des Indikators durch UV-Licht visualisiert (Abb. 36). Wie die Makrokolonie-Phänotypen bereits vermuten ließen, synthetisieren 55989 und HUSEC041 verstärkt bei 28°C Cellulose, was durch starke Calcofluor-Bindung deutlich sichtbar wurde. Der eng mit diesen Stämmen verwandte O104:H4-Ausbruchsstamm war hingegen wie auch W3110 und EDL Cellulose-negativ. Die schwache Calcofluor-Bindung rührte von Curli-Fimbrien her, die auch im W3110 bei 28°C gebildet wurden. EDL933 bildet weder Curli noch Cellulose und bindet den Indikator nicht.





**Abb. 36. EAEC zeigen Stamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Cellulose zu synthetisieren.** 5 µl von Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme wurden auf LB bzw. LBnoS mit Calcofluor getropft und für drei Tage bei 28°C bzw. 37°C inkubiert und die Farbstoff-Bindung mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Cellulose-positive Kolonien binden den fluoreszierenden Farbstoff und erscheinen heller.

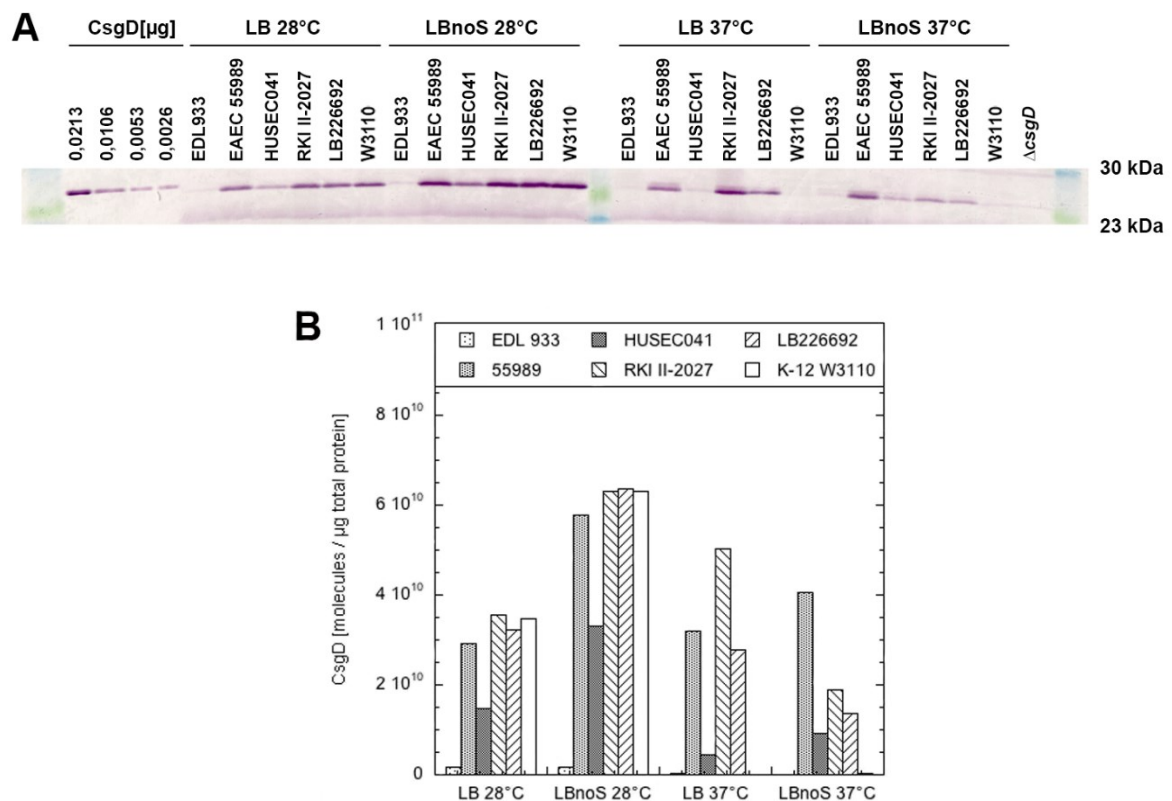
Aufgrund bioinformatischer Analysen des *bcs*-Lokus wurde eine Nukleotid-Insertion im *bcsE*-ORF identifiziert, die zwar im entsprechenden Codon die Aminosäure-Sequenz nicht ändert (CCC statt CCA; Prolin), dessen Leseraster jedoch verschiebt und möglicherweise Grund für den Cellulose-negativen Phänotyp des Ausbruchstammes ist (PhD Thesis T.L. Povolotsky). Folge des verschobenen Leserasters wäre eine verkürzte BcsE-Version, der die letzten 75 AS gegenüber der Wildtyp-Version fehlen. Das von (Fang et al, 2014) identifizierte c-di-GMP-bindende Motiv wäre in dieser BcsE-Version zwar vorhanden, die Funktion des Proteins aufgrund des fehlenden C-Terminus aber eingeschränkt oder gar aufgehoben. Zusätzlich kann der Translationsabbruch innerhalb eines Operons polare Effekte auf nachfolgende Gene haben (vgl. Kapitel 4.1.3).

---

#### 4.7.4. Die *csgD*-Expression in *E. coli* O104:H4 ist nicht Temperatur-reguliert

Expression und Synthese des Biofilm-Regulators CsgD unterliegen einem strengen regulatorischen Netzwerk, welches auf transkriptionaler, translationaler und post-translationaler Ebene modifiziert werden kann. In *E. coli* K-12 Stämmen wird dieses Netzwerk zusätzlich durch die Inkubationstemperatur bestimmt: so synthetisieren Stämme dieser Linie bei Temperaturen über 30°C kein CsgD und damit auch nicht die Matrixkomponenten Curli und Cellulose (Weber et al, 2006). Die Faktoren, die diese strikte Temperatur-abhängige Expression regulieren, sind bisher nicht bekannt. Komplexe Kolonie-Morphologie der enteroaggregativen *E. coli*-Stämme und deren Vermögen, Congo-Rot Temperatur-unabhängig zu binden, legten den Schluss nahe, dass diese Stämme den Transkriptionsregulator CsgD auch bei Temperaturen, wie sie im Darm vorzufinden sind, produzieren.

Der immunologische Nachweis von CsgD in Makrokolonien sollte Aufschluss über die Synthese des Biofilmregulators bei 28 und 37°C geben (Abb. 37). Die erhaltenen Ergebnisse spiegelten im Wesentlichen die der Makrokolonie-Phänotypen wieder: das Fehlen jeglicher Oberflächenstruktur bzw. schwache Congo-Rot-Bindung (bezogen auf Curli und Cellulose) ging mit geringen CsgD-Konzentrationen einher, stark ausgeprägte Strukturen hingegen mit hohen Konzentrationen von CsgD. Die Prophagen-Insertion im *mlrA*-ORF bei EDL933 verhinderte die Synthese von CsgD unabhängig von Temperatur und Osmolarität des Mediums, wohingegen die übrigen fünf Stämme bei 28°C hohe CsgD-Spiegel aufwiesen. Die beim K-12 Stamm W3110 zu beobachtende Temperatur-abhängige CsgD-Synthese war beim 55989, den Ausbruchstämmen und zum Teil auch beim HUSEC041 entkoppelt: alle vier Stämme wiesen nach Inkubation bei 37°C bedeutend höhere Mengen CsgD auf. Ausgehend von der Größe stationärer *E. coli*-Zellen, dem Verhältnis von Zellzahl zu OD<sub>578</sub> (Lange & Hengge-Aronis, 1991a) und dem Verhältnis von zellulärem Protein zu OD (Miller, 1972) entsprechen 10<sup>10</sup> Moleküle pro µg Gesamtprotein etwa 1000 Molekülen pro Zelle. Dementsprechend lag die Menge an CsgD beim Ausbruchsstamm bei 37°C bei etwa 1500-3000 Molekülen pro Zelle und beim 55989 gar bei 3000-4000, während im W3110 hier weniger als 100 Moleküle detektiert werden konnten.



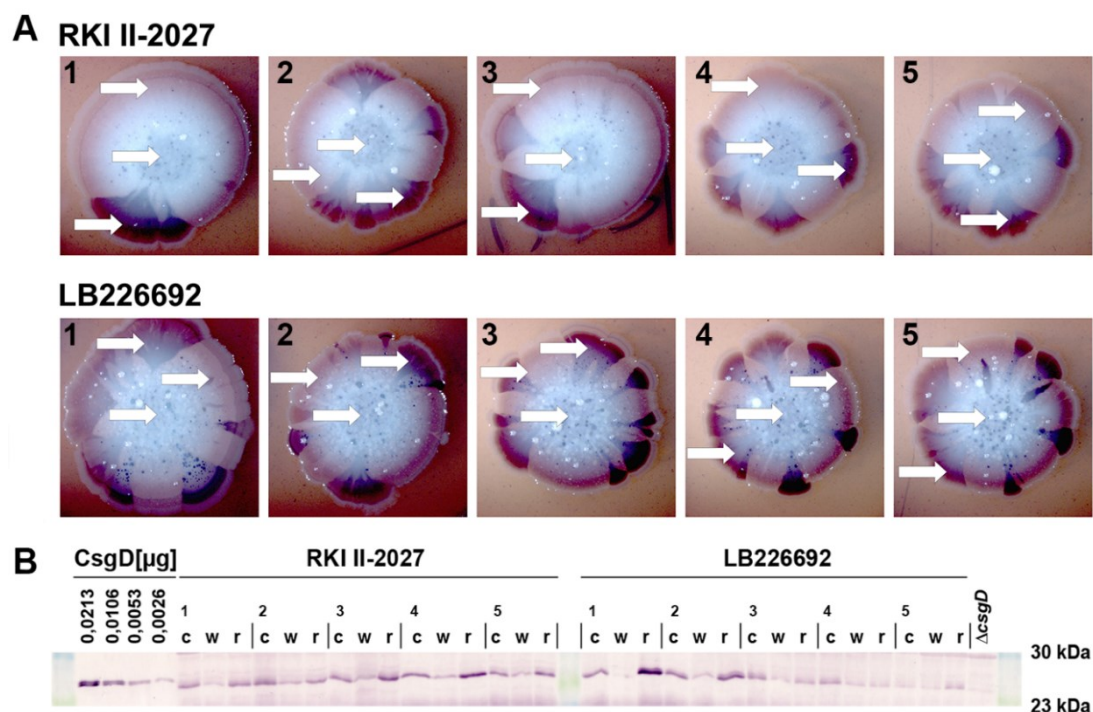
**Abb. 37. Zelluläre Spiegel des Biofilm-Regulators CsgD in Makrokolonien.** A) Für die Bestimmung zellulärer CsgD-Spiegel mittels Immunoblot wurde Zellmaterial fünf Tage alter Makrokolonien genutzt (inkubiert auf LB/LBnoS; 28°C/37°C). Pro Proben tasche wurden 7,5  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und CsgD mittels spezifischen Antikörper nachgewiesen. Das als Standard verwendete CsgD-6xHis läuft aufgrund des C-terminalen Tags etwas höher als das nicht markierte Wildtyp-Protein. B) Quantifizierung von CsgD-Molekülen pro  $\mu$ g Gesamtprotein unter Nutzung von CsgD-6xHis als Standard.

Von T. L. Povolotsky durchgeführte bioinformatische Analysen des *csgD*-Promotors zeigten keine Unterschiede zwischen HUSEC041 und W3110, die eine Erklärung für die Entkopplung von Temperatur- und Osmolaritäts-abhängiger *csgD*-Expression liefern könnten, sodass hier wahrscheinlich *in trans* wirkende Kontrollsysteme verändert sein dürften.

Basierend auf diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass der O104:H4 Ausbruchstamm und verwandte EAEC auch bei Temperaturen, wie sie im Wirt herrschen, CsgD synthetisierten, welches seinerseits die Synthese der Biofilm-Matrix stimuliert. Da der O104:H4 Ausbruchstamm keine Cellulose bildet, ist hier ein dichtes Netzwerk von Curli zu vermuten, welches besonders in Abwesenheit von Cellulose proinflammatorisch wirkt.

#### 4.7.5. O104:H4 generiert stabile Subpopulationen mit erhöhtem CsgD-Spiegel

Wie bereits in Abbildung 35 gezeigt wurde, konnte beim Ausbruchstamm bei Inkubationstemperaturen von 37°C die Bildung von Sektoren beobachtet werden, die in ihrer Congo-Rot-Bindung stark variierten. Nachdem in Abbildung 37 lediglich die mittleren CsgD-Konzentrationen einer Makrokolonie unabhängig von solchen Variationen quantifiziert wurden, wurden diese Sektoren im Folgenden näher betrachtet. Abbildung 38A zeigt jeweils fünf Makrokolonien der beiden O104:H4-Linien RKI II-2027 und LB226692 nach fünf Tagen Inkubation bei 37°C. Pfeile zeigen an, an welcher Position Zellmaterial zum immunologischen Nachweis von CsgD abgenommen wurde. Während alle Kolonien im Zentrum moderate Mengen an CsgD aufwiesen, konnten in helleren Bereichen mit schwacher Congo-Rot-Bindung nur geringe Mengen des Transkriptionsfaktors detektiert werden (Abb. 38B). In Proben aus roten Kolonie-Bereichen ließen sich hingegen hohe Mengen an CsgD nachweisen.



**Abb. 38. Makrokolonien des O104:H4 Ausbruchstamms generieren Subpopulationen mit erhöhten CsgD-Spiegel.** A) 5 μl von Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme wurden auf LBnoS mit Congo-Rot getropft und für fünf Tage bei 37°C inkubiert. Beide Isolate des Ausbruchstammes, RKI II-2027 und LB226692, bilden nach dieser Zeit Makrokolonien mit Sektoren

aus, die den Congo-Rot-Farbstoff der Platten stärker binden. Pfeile zeigen an, an welchen Stellen der Kolonien Zellmaterial entnommen wurde. B) CsgD-spezifischer Immunoblot des abgenommenen Koloniematerials (7,5 µg Gesamtprotein pro Probestasche; vgl. Abb. 37). Jede Kolonie wurde an drei Stellen beprobt: c – Zentrum der Kolonie; r – Roter Sektor; w – weißer Außenbereich.

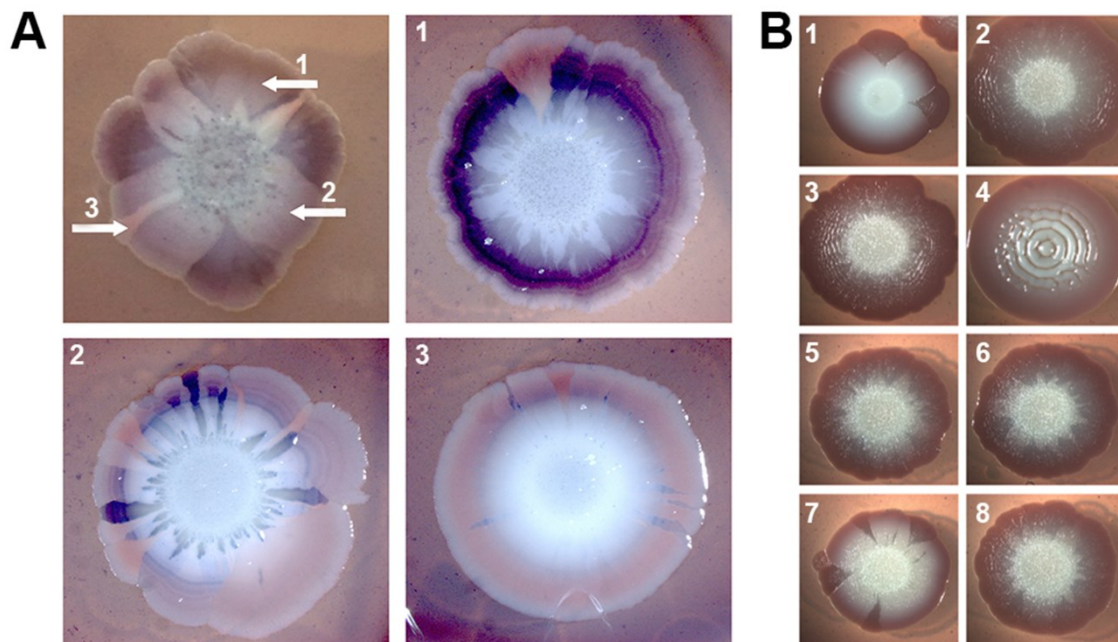
Der *E. coli* O104:H4 Ausbruchstamm unterscheidet sich demnach von den übrigen Referenzstämmen durch seine Fähigkeit, bei 37°C spontan Subpopulationen zu generieren, die sich durch erhöhte Konzentrationen des Biofilm-Regulators CsgD auszeichnen. Diese verstärkte CsgD-Synthese ließ sich durch verstärkte Bindung von Congo-Rot visualisieren und war auch nach einer zweiten Inkubation zu sekundären Makrokolonien stabil (Abb. 39A): Zellen aus roten Sektoren generierten rote Makrokolonien, während solche aus hellen Bereichen ihr Unvermögen, Congo-Rot zu binden, weitgehend beibehielten.

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob die Entwicklung roter Sektoren auf stabile und möglicherweise verschiedene Mutationen zurückzuführen war, die die Konzentration des Biofilmregulator CsgD regulieren. Zu Aufklärung dieser Fragestellung wurden aus den roten Sektoren Einzelkolonien isoliert. Diese wurden erneut als Makrokolonien angezogen, nun jedoch bei 28°C, um bessere Rückschlüsse auf Curli- und Cellulose-Bildung ziehen zu können. Im Zuge dessen konnten im Vergleich zum Phänotypen des Ausbruchstamms drei neue Morphotypen beobachtet werden (Abb. 39B). Während die Isolate 1 und 7 dem Wildtyp ähnelten, zeigten 2 und 3 eine feingliedrige Ringstruktur, wie sie auch schon in einigen Sektoren des Ausbruchstamms zu beobachten war (vgl. Abb. 35). Auffällig dicke Ringe waren im Isolat 4 zu beobachten, während die Kolonien 5, 6 und 8 keine Strukturen zeigten, jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine etwas rauere Oberfläche aufwiesen (vgl.  $\Delta dgcE$  &  $\Delta dgcM$  Abb. 13).

Das Auftreten unterschiedlicher Morphotypen zeugte davon, dass die Ausbildung von Varianten mit erhöhten CsgD-Spiegel nicht auf eine in allen Subpopulationen identische Mutation zurückzuführen sein kann. Vielmehr handelte es sich hier um verschiedene, stabile Mutationen, die CsgD und damit die Produktion amyloider Curli-Fimbrien in unterschiedlichem Ausmaß stimulieren. Die Sequenzierung des *csgD*-Promotorbereichs aller acht Linien zeigte keine Mutationen in diesem Genomabschnitt gegenüber dem Wildtyp (Sequenzanalysen durchgeführt von T.L.



Povolotsky). Zusätzlich lässt das Fehlen netzartiger Strukturen darauf schließen, dass keine dieser Makrokolonien die Fähigkeit wiedererlangt hatte, Cellulose zu produzieren.

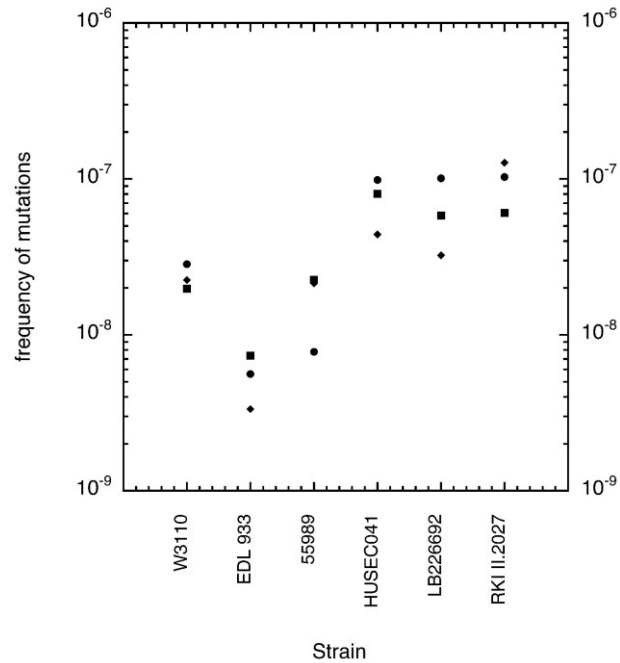


**Abb. 39. Die generierten Subpopulationen mit verstärkter Congo-Rot-Bindung sind genetisch stabil.** A) Aus mit Pfeilen angezeigten Bereichen einer 37°C-Makrokolonie wurde Zellmaterial entnommen, in LB resuspendiert und erneut bei 37°C auf LBnoS (CR) inkubiert. B) Aus roten Sektoren verschiedener 37°C-Makrokoloien wurden Einzelkolonien gewonnen und zu sekundären Makrokolonien bei 28°C herangezogen.

Regelmäßiges Auftreten solch stabiler Subpopulationen könnte darauf hindeuten, dass der O104:H4-Ausbruchstamm sich durch eine erhöhte generelle Mutationsfrequenz auszeichnet. Diese wurde für alle sechs Stämme durch das spontane Auftreten von Rifampicin-Resistenzen ermittelt und verglichen. HUSEC041 und beide Linien des Ausbruchstamms zeigten vergleichbare generelle Mutationsfrequenzen von etwa  $1 \cdot 10^{-7}$  (1 Revertant pro  $10^7$  Zellen). Die Mutationsfrequenzen von EDL933 und 55989 waren um den Faktor 5-10 geringer (1-2 Revertanten pro  $10^8$  Zellen), während im W3110 etwa 3 von  $10^8$  Zellen eine Rifampicin-Resistenz entwickelten.

Eine erhöhte generelle Mutationsfrequenz des Ausbruchstamms gegenüber den vier Vergleichsstämmen ist somit keine Erklärung für die Generierung der beschriebenen Subpopulationen, da HUSEC041 eine ähnliche Mutationsfrequenz aufwies. Vielmehr

scheinen die Mutationen hierfür spezifisch auf die CsgD-Regulation zu wirken und charakteristisch für den Ausbruchstamm zu sein.



**Abb. 40. Spontane Mutationsfrequenzen der untersuchten *E. coli*-Stämme.** Die spontane Mutationsfrequenz des Ausbruchstamms O104:H4 und der Referenzstämme wurden anhand der spontanen Mutation hin zu Rifampicin-Resistenz (50 µg/ml) ermittelt und anhand der Lebendzellzahl der verwendeten Kulturen quantifiziert. Jeder Datenpunkt repräsentiert die durchschnittliche Mutationsfrequenz einer Übernachtskultur. Alle 6 Stämme wurden dreimal unabhängig voneinander untersucht (Quadrat-, Rauten- bzw. Kreissymbol).





## 5. Diskussion

### 5.1. Die „Reparatur“ der Cellulose-Biosynthese in *E. coli* K-12 AR3110

Seit seiner Isolation 1922 wurden zahlreiche *E. coli* K-12 Linien etabliert, die sich sowohl in genetischen Charakteristika als auch in ihrer Eigenschaft, Biofilme zu bilden, stark unterscheiden (Bachmann, 1996; Richter, 2011). Allen bisher sequenzierten und heute weit verbreiteten K-12-Linien ist jedoch gemein, dass sie keine Cellulose als Biofilmkomponente bilden (Da Re & Ghigo, 2006; Richter, 2011; Zogaj et al, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Vergleich mit dem Cellulose-produzierenden *E. coli* EAEC 55989 eine Mutation im *bcsQ*-Leserahmen identifiziert, die für ein Stop-Codon anstelle von Leucin (Leu6) kodiert und nur in K-12-Linien, nicht aber in unabhängig isolierten *E. coli*, zu finden ist (Serra et al, 2013a). Folge dieser Substitution ist eine nicht nachweisbare *bcsQ::lacZ*-Expression mit polarem Effekt auf nachfolgende Gene des *yhjR-bcsQABZC*-Operons (Abb. 7 & 8). Da zwischen dem durch Mutation generierten Stop-Codon und der Ribosomen-Bindestelle des nachfolgenden Leserahmens etwa 710 nt liegen, ist dieser Bereich aufgrund fehlender Ribosomen ungeschützt vor Abbau durch Endoribonucleasen. Drei Basentriplets stromabwärts dieser Mutation befindet sich sowohl im EAEC 55989 als auch im K-12 ein GTG-Codon, welches in letzteren als alternatives als Start-Codon des *bcsQ*-Leserahmens angegeben ist. Womöglich wurde aufgrund dieser fehlerhaften Annotation bisher nicht erkannt, dass *bcsQ* in *E. coli* K-12 ein Pseudogen darstellt und mögliche Erklärungen für den Cellulose-negativen Phänotypen von *E. coli* K-12 wurden an anderer Position im *bcs*-Lokus vermutet (Römling et al, 2007). Durch Austausch des Stop-Codons durch das Leucin-Codon des Cellulose-produzierenden EAEC 55989 konnte sowohl die Expression von *bcsQ* und *bcsA* als auch die Cellulose-Synthese in *E. coli* K-12 wiederhergestellt werden (AR3110; Abb. 5 - 8).

Wie die Synthese von Curli Fimbrien werden auch Bildung und Export von Cellulose streng kontrolliert und sind dabei abhängig vom alternativen Sigmafaktor RpoS und den Transkriptionsregulatoren MlrA und CsgD (Abb. 11). FlhDC-kontrollierte Motilität und RpoS-abhängige Synthese von Matrixsubstanzen stellen dabei keine unabhängig voneinander agierenden Signalkaskaden dar (Pesavento et al, 2008; Pesavento & Hengge, 2012). Vielmehr interferiert erstgenannte auf Ebene der Sigmafaktor-

---

Kompetition, Transkription und c-di-GMP-Regulation mit der RpoS-regulierten Genexpression der Stationärphase (vgl. Kapitel 1.2.4 & Abb. 2). In diesem Zusammenhang lässt sich die Mehrheit der Kolonie-Phänotypen flagellarer Deletionsmutanten auf veränderte *pdeH*-Expression zurückführen. *motA* und *fliC* unterliegen als Klasse-3-Gene der gleichen transkriptionalen Kontrolle wie *pdeH* und sind infolgedessen nicht an dessen Regulation beteiligt. Dennoch zeigten entsprechende Deletionsmutanten deutlich schwächere Koloniestrukturen, die reduzierte c-di-GMP-Spiegel vermuten lassen (Abb. 12).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen zudem deutliche Unterschiede im Erscheinungsbild der Flagellen einer *motA*-Mutante gegenüber dem Wildtyp: während WT-Flagellen eng miteinander verflochten und aufgrund wechselseitiger Zugkräfte straff zwischen den Zellen gespannt sind, erscheinen die bewegungsunfähigen Flagellen der Mutante schraubenförmig verdreht, ähnlich einer Helix (Serra et al, 2013b). Das Auftreten solcher Zug-Kräfte und Spannungen – besonders bei hoher Zelldichte – könnte als mechanisches Input-Signal auf die intrazelluläre c-di-GMP-Regulation wirken und auf diesem Wege auch Curli- bzw. Cellulose-Synthese aktivieren. Deletion von *fliC*, dem Strukturgen der extrazellulären Untereinheit des Flagellen-Filaments, unterbindet diese Form der Signal-Aufnahme vollständig (Serra et al, 2013b), während die Mutation des Haken-Regulators FliK oder einzelner Komponenten des Chemotaxis-Systems und damit einhergehend die fehlende Kontrolle von Flagellenausrichtung bzw. Rotationsrichtung die entstehenden Zugkräfte möglicherweise noch verstärkt und die Matrix-Synthese stimuliert. Ob diese Art der Signaltransduktion in Form erhöhter DGC- bzw. verringerter PDE-Aktivitäten oder aufgrund proteolytischer Regulation in die Biofilm-Kaskade integriert wird, ist Bestandteil der Dissertation von M. Sc. V. Pfiffer.

Eine sowohl temporär als auch lokal streng regulierte Expression von Flagellen, amyloiden Curli Fimbrien und Cellulose ist somit essentiell für die strukturelle Integrität des Biofilms (Serra et al, 2015). Einen dieser Regulations-Punkte stellt c-di-GMP dar, welches die flagellare Motilität inhibiert und gleichermaßen die Synthese der Biofilmmatrix stimuliert. Der in dieser Arbeit entstandene, „de-domestizierte“ *E. coli* K-

12 Stamm AR3110 wurde im weiteren Verlauf dazu genutzt, die c-di-GMP-regulierte Produktion von Cellulose in Makrokolonien zu untersuchen.

## 5.2. Ein c-di-GMP-Modul aus DgcC und PdeK reguliert die Cellulose-Synthese

*E. coli* K-12 kodiert für 29 GGDEF- und EAL-Domänen-Proteine, von denen 25 weitgehend konservierte Domänen aufweisen und damit potentiell an der Umsetzung von c-di-GMP beteiligt sind (vgl. Tab. A1). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle dieser 29 Proteine im Rahmen der Biofilm-Bildung in Makrokolonien untersucht, mit dem Ziel, ein spezifisch auf die Cellulose-Synthese wirkendes c-di-GMP-Regulationsmodul zu identifizieren. Durch Deletion einzelner GGDEF-/EAL-kodierender Leserahmen konnten sechs Gene identifiziert werden, die im Makrokolonie-Biofilm an der Regulation der Matrix-Synthese beteiligt sind (Abb. 13). Vier dieser Gene (*dgcE*, *dgcM*, *pdeH* & *pdeR*) regulieren die Expression des Biofilm-Regulators CsgD und damit die Synthese amyloider Curli Fimbrien und Cellulose gleichermaßen (Lindenberg et al, 2013; Pesavento et al, 2008; Weber et al, 2006)(Abb. 13). Von allen 12 DGCs in *E. coli* K12 war im Rahmen dieser Untersuchungen allein DgcC (YaiC) essentiell für die Bildung von Cellulose (Abb. 13, 14 & A2, A3), während PdeK (YhjK) einen negativen Einfluss auf diese ausübte (Abb. 13). Aufgrund ihrer spezifischen Wirkung auf die Cellulose-Synthese stellen DgcC und PdeK damit ein weiteres c-di-GMP-Modul im Rahmen der *E. coli*-Biofilm-Bildung dar. Die c-di-GMP-abhängige Regulation greift dabei nicht auf Ebene der *bcs*-Transkription (Abb. 20), sondern post-translational durch Bindung von c-di-GMP an die PilZ-Domäne von BcsA und damit einhergehender Aktivierung der Glycosyltransferase-Aktivität.

*dgcC* ist zusammen mit den Curli-Strukturgenen *csgBAC* Teil des RpoS-CgsD-Regulons und wurde wie sein *Salmonella*-Homolog *adrA* bereits in früheren Publikationen als aktivierende Komponente der Cellulose-Synthese beschrieben (Römling et al, 2000; Zogaj et al, 2001). Obwohl diese Studien sowie das Vorhandensein aller zur c-di-GMP-Synthese nötigen Aminosäure-Reste bereits auf die enzymatische Aktivität hindeuten, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals *in vitro* nachgewiesen,

---

dass DgcC eine aktive DGC darstellt, die c-di-GMP aus GTP synthetisiert (Abb. 18). In diesem Zusammenhang wurde auch die Nanodisc-Technologie zum ersten Mal in Verbindung mit der Synthese von c-di-GMP angewendet. Die zur Aktivierung nötige Bildung von Dimeren wird durch die N-terminale MASE2-Domäne vermittelt (Abb. 23), während die cytoplasmatischen GGDEF-Domänen an dieser Interaktion nicht beteiligt sind und das Enzym ohne Integration in die Membran keine Aktivität zeigt. Da DgcC *in vitro* ohne spezifische Input-Signale aktiv ist, kann die MASE2-Domäne in DgcC vielmehr als Dimerisierungs- denn als Sensor-Domäne betrachtet werden. Darüber hinaus konnte auch für andere MASE2-Domänen-Proteine gezeigt werden, dass sie nur mit der Sensor-Domäne aktiv sind (Topal et al, 2012), und diese möglicherweise auch hier der Dimerisierung dient. Eine inhibierende Wirkung durch periplasmatische bzw. extrazelluläre Reize, die im Versuchsaufbau nicht präsent waren, kann an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche Ebene der Regulation stellt darüber hinaus die CsgD-abhängige Expression von *dgcC* dar.

DgcC bindet GTP mit einer  $K_d$  von 2  $\mu$ M (Abb. 19) und zeigt trotz konservierter I-Site keine Produkthemmung durch hohe Konzentrationen von c-di-GMP (Abb. 18). Bei mittleren zellulären GTP-Konzentrationen von etwa 0,4 mM bis 1,66 mM liegt somit stets eine Sättigung mit Substrat vor (Buckstein et al, 2008). Basierend auf diesen Daten kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass DgcC – sofern exprimiert und als Dimer vorliegend – konstitutiv aktiv ist und in Abhängigkeit seines GGDEF-Motivs die Cellulose-Synthese aktiviert (Abb. 27). Gleichzeitig kann eine *dgcC*-Deletion durch moderate Überexpression anderer DGCs *in trans* komplementiert werden (Abb. 29A), was für *dgcM*-Deletionen im Rahmen der *csgD*-Expression nicht möglich ist (Lindenberg et al, 2013). Darüber hinaus setzt eine enzymatisch inaktive DgcM-Variante (GGAAF) die *csgD*-Expression herab, verhindert sie jedoch nicht (Lindenberg et al, 2013), wie *dgcC*-GGAAF in Bezug auf die Cellulose-Synthese (Abb. 27). Diese Unterschiede beider DGCs weisen darauf hin, dass DgcC im Cellulose-spezifischen c-di-GMP-Modul eine andere Rolle einnimmt, als DgcM im CsgD-spezifischen Modul. Als c-di-GMP-regulierendes Gegenstück zu DgcC galt bislang PdeD (YoaD) (Brombacher et al, 2003). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit die enzymatische Aktivität

---

von PdeD erstmals gezeigt wurde, konnte kein Einfluss auf die Cellulose-Synthese festgestellt werden. Auch Interaktionen mit dem Bcs-Komplex, wie sie etwa für DgcC und PdeK nachgewiesen wurden, konnten für PdeD nicht gezeigt werden (Abb. 21). Die Annahmen von Brombacher *et al.* fußen zudem auf Studien mit PdeD-Überexpressions-Plasmiden im *E. coli* K-12 MG1655, der höchstens geringe Mengen Cellulose produziert, was eine Analyse der Regulation des Polysacharids durchaus erschwert (Da Re & Ghigo, 2006; Richter, 2011).

Stattdessen konnte aufgrund der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse gezeigt werden, dass PdeK die PDE im Cellulose-spezifischen c-di-GMP-Modul darstellt (Abb. 13). *pdeK* ist in *E. coli* und anderen *Enterobacteriaceae* stromabwärts von *bcsC* lokalisiert, selbst jedoch nicht Teil des *yljR-bcsQABZC*-Operons. Ein *pdeK*-spezifischer Phänotyp wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nur in *S. Typhimurium* in Abhängigkeit des DSB-Systems beschrieben. Anwar et al. zeigen jedoch eine ausschließlich CsgD-vermittelte Regulation von Curli und Cellulose, nicht aber eine spezifische Wirkung auf die Cellulose-Synthese allein (Anwar et al, 2014). Die hier vorliegende Arbeit weist PdeK nun erstmals eine konkrete Rolle im c-di-GMP-Regulationsnetzwerk von *E. coli* zu, bei der das Protein als negativer Regulator auf die Synthese extrazellulärer Cellulose wirkt. Abweichend von DgcC ist für die enzymatische Aktivität von PdeK der cytoplasmatische C-terminus (degenerierte GGDEF- & konservierte EAL-Domäne) ausreichend (Abb. 17). Für PdeK ist somit keine Aktivierung der EAL-Domäne durch die Membran- oder periplasmatische Domäne nötig. Konträr zu DGCs sind einige PDEs auch als Monomer aktiv (Schmidt et al, 2005). Dennoch konnte auch für PdeK die Ausbildung von Dimeren innerhalb der Membran-Domänen gezeigt werden, die in Abwesenheit der cytoplasmatischen Domänen noch stimuliert wird (Abb. 24). Darüber hinaus wurde durch Deletion der periplasmatischen GAPES3-Domäne die Kolonien-Morphologie verstärkt (Abb. 31). Folglich ist diese Domäne nicht essentiell für die PDE-Aktivität, stimuliert diese jedoch. Ausgehend von diesen Beobachtungen können folgende Schlussfolgerung bezüglich der intra-molekularen Regulation von PdeK gezogen werden: i.) zur Umsetzung von c-di-GMP bedarf es keiner Aktivierung durch die Membran- oder periplasmatische GAPES3-Domäne; ii.) vielmehr könnte die PDE-Aktivität durch Membran-Domänen gehemmt werden (u. U. aufgrund von

Dimerisierung) und iii.) die GAPES3-Domäne antagonisiert diese Hemmung. Die GAPES3-Domäne wirkt unter diesen Annahmen als doppelt-negative Vorsteuerung (Feed Forward) auf die Enzym-Aktivität und stimuliert so den Abbau von c-di-GMP (GAPES3  $\dashv$  TMD  $\dashv$  PDE-Aktivität  $\dashv$  c-di-GMP). Ob diese Regulation durch Integration periplasmatischer Signale geschieht, kann im Rahmen dieser Arbeit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Vergleichbar zu DgcC reguliert auch PdeK die Cellulose-Synthese in Abhängigkeit seiner Enzym-Aktivität (Abb. 30). Infolgedessen ist PdeK nicht in die Gruppe der c-di-GMP-regulierten Trigger-Enzyme einzuordnen. Analog zu DgcM-PdeR konnten auch zwischen DgcC und PdeK Protein-Protein-Interaktionen beobachtet werden (Abb. 21 & 26). An dieser sind neben der PdeK-GAPES3-Domäne die Transmembran-Domänen beider Proteine beteiligt (Abb. 25). Obwohl für die Regulation der Cellulose-Synthese ausschließlich die Aktivität von DgcC und PdeK essentiell war, und PdeK auf diese nur Anwesenheit von DgcC wirkte (Abb. 27, 30 & 32), kann eine darüber hinaus stattfindende wechselseitige Kontrolle durch Interaktion mit dem Partner an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Interessant ist außerdem, dass *dgcC* und *pdeK* bei einer vergleichenden Genomanalyse von 61 *E. coli*-Stämmen keine Mutationen aufweisen und damit zusammen mit sechs anderen GGDEF- und EAL-Protein-kodierenden Gene eine Kern-Gruppe c-di-GMP-assoziiierter Gene darstellen. Alle übrigen GGDEF- und EAL-Leserahmen sind nicht in allen Stämmen konserviert (Povolotsky & Hengge, 2015). Dies kann bedeuten, dass DgcC und PdeK im Rahmen der Cellulose-Synthese nicht austauschbar sind, da sie nicht nur aufgrund ihrer Enzym-Aktivität auf BcsA wirken. Im weiteren Verlauf soll der spezifische Mechanismus diskutiert werden, durch den DgcC-PdeK auf die Cellulose-Synthese wirken und der sich in seiner Form von DgcE-PdeH und DgcM-PdeR unterscheidet.

### 5.3. Lokale Signaltransduktion durch Aufbau eines c-di-GMP-Gradienten

Der bakterielle Cellulose-Synthese-Apparat ist ein Multi-Protein-Komplex, der sich unter anderem aus einer c-di-GMP-aktivierten Glycosyltransferase (BcsA) und einer Co-Synthase (BcsB) in der inneren Zellmembran zusammensetzt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch DgcC und PdeK Teil dieses Komplexes sind (Abb. 21). Die Spezifität beider Proteine lässt sich somit durch Co-Lokalisation mit BcsA erklären. BcsA stellt in diesem Modul aufgrund seiner Domänen gleichzeitig c-di-GMP-bindenden Effektor (PilZ-Domäne) und Zielmolekül (GT-Domäne) dar.

Besonders interessant ist jedoch, dass die Protein-Interaktion nicht direkt zwischen DgcC bzw. PdeK und BcsA stattfindet, sondern indirekt über die Co-Synthase BcsB. Nachdem bereits eine Stabilisierung von BcsA als mögliche Funktion von BcsB vorgeschlagen wurde (Omadjela et al, 2013), zeigen die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse eine weitere Rolle für die Co-Synthase auf: die Interaktion von BcsB mit DgcC und PdeK gewährleistet die Ausbildung eines Multi-Enzym-Komplexes, der eine spezifische Wirkung beider Enzyme auf die Cellulose-Synthase BcsA zulässt. Während für die Regulation der Cellulose-Synthase GGDEF- bzw. EAL-Motive und damit Enzymaktivitäten von DgcC bzw. PdeK zwingend erforderlich sind, ist die Protein-Interaktion mit BcsB unabhängig von diesen (Abb. 22). Fehlende Regulation der Cellulose-Synthase in DgcC-GGAUF- bzw. PdeK-AAL-Makrokolonien ist demnach nicht auf eingeschränkte Co-Lokalisation mit dem BcsA-BcsB-Komplex zurückzuführen (Abb. 27 & 30), sondern gänzlich abhängig von Synthese und Abbau von c-di-GMP.

Aufgrund dessen ergibt sich folgendes Konzept zur Wirkungsweise von DgcC-PdeK: Innerhalb eines Multi-Enzym-Komplexes synthetisiert dimerisches DgcC in unmittelbarer Umgebung zu BcsA hohe Mengen c-di-GMP. Dieses kann durch Bindung an den Effektor (PilZ) das Zielmolekül (GT) allosterisch aktivieren und damit die Cellulose-Synthase stimulieren. Gleichzeitig ist PdeK Teil des Komplexes und antagonisiert durch Abbau von c-di-GMP die Wirkung von DgcC. BcsB nimmt an dieser Stelle eine Rekrutierungs-Funktion ein und garantiert durch multiple Protein-Interaktionen die spezifische Wirkung des von DgcC-PdeK regulierten c-di-GMP-

---

Gradienten auf BcsA. Äußere Signale können innerhalb des Komplexes möglicherweise durch die DgcC-MASE2-Domäne (Hemmung der DgcC-Dimerisierung) oder die PdeK-GAPES3-Domäne (doppelt-negative Regulation der PDE-Aktivität) integriert werden oder wirken bereits transkriptional bzw. translational auf die Expression der Komponenten.

An dieser Stelle fügt sich auch die von Pultz et al. aufgestellte Theorie zur Konzentrations-abhängigen Stimulation von PilZ-Domänen-Proteinen ein: YcgR, PdeR und BcsA zeigen verschiedene c-di-GMP-Bindeaffinitäten (0,2  $\mu\text{M}$ ; etwa 1  $\mu\text{M}$ ; 8,2  $\mu\text{M}$ ) und werden bei steigenden zellulären c-di-GMP-Konzentrationen in Abhängigkeit dieser nacheinander aktiviert (Lindenberg et al, 2013; Pultz et al, 2012). Je nach Spezies und Wachstumsphase bewegt sich die mittlere c-di-GMP-Konzentration im Bereich von etwa 100 nM bis zu wenigen  $\mu\text{M}$  und ist damit ausreichend, um die Bindung an YcgR und PdeR zu stimulieren, nicht aber die an BcsA (Christen et al, 2010; Hengge, 2009). Durch Co-Lokalisation mit dem Cellulose-Synthese-Komplex kann DgcC die c-di-GMP-Konzentration in unmittelbarer Umgebung stark erhöhen, ohne jedoch selbst in seiner Synthese-Leistung durch Produkt-Inhibition gehemmt zu werden. Die Interaktion selbst hat dabei keine regulatorische Wirkung, da ein enzymatisch inaktives Protein (DgcC-GGAFF) zwar mit BcsB interagiert, die Cellulose-Synthese aber nicht aktiviert.

Die DgcC-PdeK-abhängige Regulation von BcsA unterscheidet sich damit grundlegend von der Wirkungsweise der bisher beschriebenen Module. Im Gegensatz zu DgcE-PdeH wirken DgcC und PdeK aufgrund multipler Protein-Interaktionen sehr spezifisch auf nur einen Effektor. Den Protein-Interaktionen fällt innerhalb dieses Moduls jedoch keine regulatorische Funktion zu, wie im DgcM-PdeR-Modul. Vielmehr wird auf diesem Weg die Co-Lokalisation mit dem Effektor garantiert. Die Regulation hingegen wird durch Modulation eines lokalen c-di-GMP-Spiegels in unmittelbarer Umgebung zu BcsA gewährleistet, was dem Konzept der lokalen Signaltransduktion über sekundäre Botenstoffe entspricht („local signalling“).

Die direkte Interaktion von DGC und PDE mit einer Glycosyltransferase ist ebenfalls für die PGA-Synthese in *Y. pestis* bekannt. Auch hier wird vorgeschlagen, dass DGC und PDE durch Modulation des c-di-GMP-Spiegels in direkter Umgebung des



---

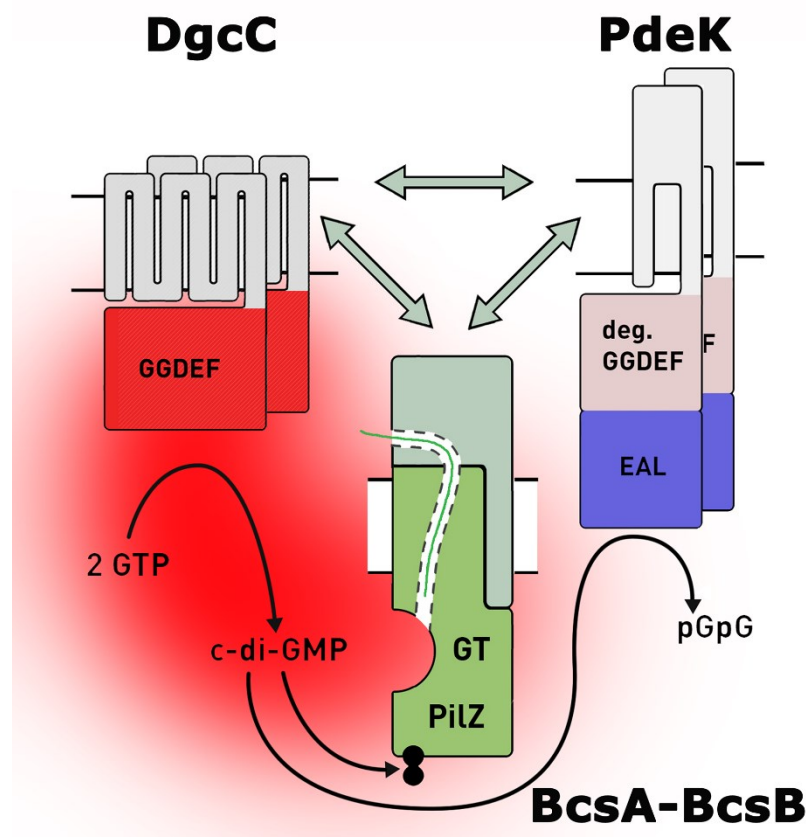
Synthese-Apparates diesen regulieren (Bobrov et al, 2008). Gleichzeitig interagieren auch DgcO (YddV) und PdeO (YddU) mit ihrem Effektor, der PNPase im RNA-Degradosom, und regulieren diese in Abhängigkeit ihrer Enzymaktivitäten (Tuckerman et al, 2011). Obwohl der genaue Wirkmechanismus dieser Beispiele bisher nicht aufgeklärt ist, kann vermutet werden, dass es sich hier um vergleichbar wirkende „local signalling“-Module handelt. Anhand dieser Systeme wird deutlich, dass die Wirkungsweise des hier beschriebenen DgcC-PdeK-Moduls nicht nur auf die Cellulose-Synthese in *E. coli* beschränkt ist, sondern einen weiteren grundlegenden Mechanismus der c-di-GMP-abhängigen Signaltransduktion darstellt, der auch auf andere c-di-GMP-regulierte Prozesse anwendbar ist.

Obwohl in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass DgcC und PdeK spezifische Regulatoren der Cellulose-Synthese darstellen, ist die Produktion amyloider Curli Fimbrien nicht gänzlich unbeeinflusst von diesem Modul. So hatten *dgcC*-Deletionsmutanten im AR3110-Hintergrund zwar einen bezüglich der Kolonie-Morphologie reduzierten Phänotypen, der jedoch nicht identisch mit dem einer *ΔbcsA*-Deletion war (vgl. Abb. 10 & 27). Auch im Cellulose-negativen W3110 zeigte *ΔdgcC* eine Kolonie-Struktur, die auf reduzierte Matrix-Synthese hindeutete (Abb. A1). DgcC-PdeK kontrollieren demzufolge keinen abgeschlossenen c-di-GMP-Pool, sondern vielmehr einen lokalen Gradienten. Die Konzentration des sekundären Botenstoffes ist somit in unmittelbarer Umgebung von BcsA hoch genug, um dessen Glycosyltransferase-Domäne zu aktivieren. Durch Diffusion wirkt das von DgcC generierte c-di-GMP aber auch auf PdeR und damit auf die *csgD*-Expression. DgcC reguliert demnach nicht nur auf die Cellulose-Synthese positiv, sondern stimuliert gleichermaßen seine eigene Expression in Form einer positiven Rückkopplungsschleife (Feedback Loop). Aufgrund von Co-Lokalisation mit dem eigentlichen Effektor, BcsA, wird diese Überschneidung verschiedener c-di-GMP-Module jedoch eingeschränkt. Für PdeK hingegen konnte keine über die Cellulose-Regulation hinausgehende Funktion in der Matrix-Synthese identifiziert werden (Abb. 15), da es c-di-GMP nur in unmittelbarer Umgebung zur Membran abbauen kann und damit lokal getrennt vom DNA-bindenden Komplex DgcM-PdeR-MlrA agiert.

Zusammenfassend ergibt sich für die c-di-GMP-abhängige Synthese von Matrixsubstanzen folgendes Bild: Während die zelluläre Konzentration an c-di-GMP in post-exponentiell wachsenden Zellen durch PdeH gering gehalten wird, nimmt sie mit Eintritt in die stationäre Phase zu, da nun vermehrt DGCs exprimiert werden, die FlhDC-abhängige *pdeH*-Expression jedoch abnimmt (Pesavento et al, 2008; Weber et al, 2006). Der c-di-GMP-Spiegel steigt weit genug an, um YcgR zu stimulieren und damit die Flagellen-Rotation zu inhibieren (Boehm et al, 2010; Pultz et al, 2012). Gleichzeitig werden die Komponenten des zweiten c-di-GMP-Moduls (*dgcM*, *pdeR* und *mlrA*) und die Bestandteile des Cellulose-Synthese-Komplexes (*yhjR-bcsQABZC*) exprimiert. Ist die c-di-GMP-Syntheserate von DgcE hoch genug, um die PDE-Aktivität des Trigger-Enzyms PdeR zu stimulieren, entlässt dieses den DgcM-MlrA-Komplex. DgcM generiert zusätzliches c-di-GMP, welches ebenso von PdeR abgebaut wird. Dies gewährleistet die kontrollierte *csgD*-Expression und damit die Bildung von Curli Fimbrien und DgcC (Lindenberg et al, 2013). Gegenüber DgcE und DgcM liegt somit nicht nur eine lokale Sequestrierung von DgcC vor, sondern aufgrund der zeitlich verzögerten Expression auch eine temporale. DgcC ist in der inneren Zellmembran Teil des Cellulose-Synthese-Komplexes und generiert hier einen lokalen c-di-GMP-Gradienten, der hoch genug ist, um BcsA zu stimulieren und die Cellulose-Synthese zu aktivieren (Abb. 41). Gleichzeitig speist es wie DgcE und DgcM auch den PdeR-c-di-GMP-Spiegel. Nimmt jedoch die Aktivität von DgcE (und DgcM) und damit die c-di-GMP-Konzentration ab, antagonisiert PdeR erneut den DgcM-MlrA-Komplex und die *csgD*-Expression wird eingestellt. Diese Form der seriellen Aktivierung einzelner c-di-GMP-Module garantiert zusammen mit den verschiedenen c-di-GMP-Bindungsaffinitäten der Effektoren eine strenge zeitliche Abfolge von Inhibierung der Flagellen-Rotation, *csgD*-Expression und Matrix-Synthese.

Fraglich bleibt, warum es in Makrokolonie-Biofilmen bereits in der mittleren Schicht zur Cellulose-Synthese kommt, während Curli Fimbrien vor allem im oberen Drittel der Kolonie gebildet werden, obwohl *dgcC* und *csgBAC* Teil des gleichen Regulons sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bereits die DgcM-PdeR-unabhängige Expression von CsgD ausreichend für die Synthese von Cellulose ist (Abb. A3), während die *csgB*-Expression im  $\Delta dgcM\text{-}\Delta pdeR$ -Hintergrund weit unter der des

Wildtyps liegt (Lindenberg et al, 2013). Möglich ist hier eine CsgD-Konzentrationsabhängige und damit zeitlich verzögerte Expression von *csgBAC*, die Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein sollte. Gleichzeitig sollte die Regulation durch nicht-kodierende sRNAs nicht außer Acht gelassen werden, die auf Ebene der *rpoS*-/*dgcM*- und *csgD*-Expression in die Synthese einer Biofilm-Matrix eingreifen können (Mika & Hengge, 2013; Mika & Hengge, 2014).



**Abb. 41. DgcC generiert nahe der Zellmembran einen lokalen c-di-GMP-Gradienten, der BcsA aktiviert oder durch PdeK abgebaut wird.** DgcC und PdeK interagieren unter- und miteinander innerhalb ihrer Transmembrandomänen und über BcsB mit dem Cellulose-Synthase-Komplex. DgcC generiert dabei aus GTP einen lokalen c-di-GMP-Gradienten in unmittelbarer Umgebung zu BcsA und PdeK. Dieses bindet an die PilZ-Domäne von BcsA und aktiviert so die Cellulose-Synthese oder wird von PdeK zu pGpG abgebaut.

Das hier vorgestellte c-di-GMP-Regulationsmodul stellt somit das erste auf „local signalling“-basierende Modul in *E. coli* dar, in welchem ein Tandem-Paar aus DGC und PDE aufgrund seiner Enzymaktivitäten einen lokalen Gradienten von c-di-GMP generiert und durch Protein-Interaktionen mit seinem Effektor-Molekül co-lokalisiert

ist (Abb. 41). Diese Co-Lokalisation gewährleistet die nötige Spezifität. Dabei unterscheidet sich dieses Modul in seiner Wirkungsweise grundlegend von den anderen beiden Biofilm-assoziierten Modulen, welche Wachstumsphasen-abhängig durch Synthese und Abbau von c-di-GMP mehrere Effektoren regulieren (DgcE-PdeH) bzw. durch Protein-Interaktion und die duale Wirkung eines Trigger-Enzyms auf einen Effektor aber mehrere zelluläre Outputs wirken (DgcM-PdeR).

#### **5.4. Veränderte Biofilm-Matrix-Produktion als mögliche Erklärung für die hohe Virulenz des *E. coli* O104:H4**

Im Sommer 2011 ereignete sich im mitteleuropäischen Raum ein schwerer Ausbruch pathogener *E. coli* O104:H4. Der Erregerstamm zeichnete sich durch eine im Vergleich zu anderen EHEC-Ausbrüchen ausgesprochen hohe Virulenz aus: während sich die Krankheit bei etwa 3000 Patienten als Gastroenteritis äußerte, entwickelten mehr als 20% der infizierten Personen HUS (Bielaszewska et al, 2011; Mellmann et al, 2011; Muniesa et al, 2012). Damit verbundene Schädigungen von Nierengewebe und Darmepithel werden durch die bakterielle Ausschüttung von Shiga-Toxinen ausgelöst (Andreoli et al, 2002). Trotz seiner Fähigkeit, Shiga-Toxin 2 zu synthetisieren, veranlassen Genom-Analysen dazu, den Ausbruchstamm O104:H4 in die Gruppe der enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) einzuordnen. Das autoaggregative Verhalten gegenüber HeP-2-Zellen bestätigt diese Annahme auch auf mikroskopischen Wege, während eine für EHEC übliche Intimin-abhängige Adhäsion ausgeschlossen werden kann (Bielaszewska et al, 2011). Auch der 2001 isolierte HUSEC041 zeigt eine Kombination aus Stx2-Synthese und Ziegelstein-artigen Aggregationsverhalten an Epithelzellen vermittelt durch aggregative adhärente Fimbrien (AAF)(Bielaszewska et al, 2011; Mellmann et al, 2008). Neben diesen auf pathogene Stämme beschränkten Virulenz-Faktoren können auch Curli Fimbrien, die ebenso von kommensalen *E. coli* gebildet werden, die Anheftung an Epithelzellen unterstützen (Olsen et al, 1998; Saldana et al, 2009).

Bioinformatische Analysen c-di-GMP-assoziiierter Gene lassen darauf schließen, dass der O104:H4-Ausbruchstamm unter anderem aufgrund einer stark exprimierten DGC

(DgcX) eine erhöhte Potential aufweist, c-di-GMP zu akkumulieren und infolgedessen die Synthese extrazellulärer Matrixsubstanzen zu stimulieren (PhD Thesis T. L. Povolotsky)(Richter et al, 2014). Dementsprechend stellte sich die Frage, ob es abgesehen von der Kombination aus Shiga-Toxin-Synthese und aggregativer Biofilmbildung einen weiteren Erklärungsansatz für die erhöhte Virulenz dieses Stammes gibt, der auf dem Vorhandensein von Curli Fimbrien und deren proinflammatorische Wirkung im Wirt fußt (Bian et al, 2000; Tükel et al, 2010; Tükel et al, 2009).

Eine vergleichende Analyse von Makrokolonien, durch die Aussagen über die Produktion von Curli und Cellulose gemacht werden konnten, unterstützt diese Hypothese: auch bei Inkubationstemperaturen von 37°C bilden der Ausbruchstamm und verwandte O104:H4 Curli Fimbrien und den Biofilm-Regulator CsgD (Abb. 34 & 35). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der O104:H4-Ausbruchstamm stabile Subpopulationen bildet, die sich durch eine noch verstärkte CsgD-Synthese und damit verbundener erhöhter Curli-Produktion auszeichnen (Abb. 37-39). Das Auftreten solcher Subpopulationen ist nicht auf eine erhöhte generelle Mutationsfrequenz des Ausbruchstamms zurückzuführen (Abb. 40) und auch die durch T. L. Povolotsky durchgeführte Sequenzierung bekannter Mutator-Gene, die unter anderem für DNA-Reparatur-Systeme kodieren, zeigte keine Auffälligkeiten (Chopra et al, 2003; Richter et al, 2014). Vielmehr ist die Bildung dieser Subpopulationen auf verschiedene Mutationen zurückzuführen, die sehr spezifisch auf die *csgD*-Expression zu wirken.

Neben der Bildung von Curli Fimbrien unterliegt auch die Cellulose-Biosynthese einer CsgD-abhängigen Genexpression (Römling et al, 2000). Beide Matrixkomponenten interagieren im Biofilm miteinander und bilden Netz- und Gewebe-artige Strukturen aus, die sich schützend um die Zellen legen (Serra et al, 2013a; Serra et al, 2013b). Der Ausbruchstamm synthetisiert im Gegensatz zu 55989 und HUSEC041 keine Cellulose (Abb. 36), gebildete Curli Fimbrien liegen dementsprechend frei, ohne in ein Netzwerk aus Cellulose eingewoben zu sein. Im Wirtsorganismus wirken die amyloiden Fimbrien proinflammatorisch: die Curli-Untereinheit CsgA bindet an Toll-ähnliche Rezeptoren und stimuliert die Produktion des Cytokins Interleukin-8 (IL-8)(Bian et al, 2000; Tükel et al, 2010; Tükel et al, 2009). IL-8 dient der wirtseigenen Immunabwehr als chemischer Botenstoff und rekrutiert

---

Leukozyten und Neutrophile zum Entzündungsherd (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992). Neben Curli stimulieren auch Shiga-Toxine trotz ihrer inhibierenden Wirkung auf die Proteinbiosynthese die IL-8-Sekretion (Thorpe et al, 1999), welches wiederum die Ausschüttung der Toxine in *E. coli* weiter induziert (Wagner et al, 2001). Das durch Entzündungen geschädigte Gewebe nimmt Stx2 besser auf und Neutrophile gewährleisten zudem eine effizientere Verteilung der Toxine mit dem Blutstrom im Körper (te Loo et al, 2000). Eine vergleichbare Curli-abhängige Wirkungsweise wurde auch für einen Stx-produzierenden *E. coli* O157:NM vermutet (Rosser et al, 2008).

Der O104:H4 Ausbruchstamm trägt nur den *stx2*-Genlokus. Laut Ostroff et al. wurden Stämme, die ausschließlich Stx2 produzieren, weitaus häufiger aus HUS-Patienten isoliert als Linien, die Gen-Loci für beide Toxine oder nur Stx1 tragen (Ostroff et al, 1989). In ihrer Arbeit diskutieren sie sowohl die Möglichkeit eine höheren Syntheserate von Stx2 (besonders in Abwesenheit von *stx1*), als auch das Vorhandensein anderer, zu dieser Zeit noch unbekannter Virulenzfaktoren. Ausgehend von den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen kann angenommen werden, dass es sich hier um Curli Fimbrien handelt, die aufgrund der Prophagen-Insertion im *mlrA*-ORF von Stx1-produzierenden Stämmen nicht synthetisiert werden.

Der lytische Zyklus *stx*-kodierender Phagen kann durch die Behandlung mit einigen Antibiotika induziert werden, was wiederum die *stx*-Expression stimuliert (Wagner et al, 2002; Zhang et al, 2000). So leitet das Fluorchinolon Ciprofloxacin in Abhängigkeit der bakteriellen SOS-Antwort den lytischen Zyklus *stx*-kodierenden Phagen in *E. coli* O157:H7 ein, was die Produktion von Shiga-Toxinen *in vitro* erhöht und darüber hinaus den Transfer der Phagen in andere *E. coli* stimuliert (Zhang et al, 2000). Eine Kombination aus Antibiotika-Behandlung und Phagen-induzierter Lyse ermöglicht so eine verstärkte Synthese und Freisetzung der Toxine und damit verbunden eine stärkere Gewebeschädigung. Neben ihrer Wirkung auf Prophagen können Antibiotika auch die RpoS-regulierte generelle Stressantwort induzieren und damit zusätzlich die CsgD-abhängige Curli-Expression stimulieren. Im Rahmen des O104:H4-Ausbruchs kam im Raum Lübeck das Makrolid-Antibiotikum Azithromycin zur Anwendung, welches die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt und die Ausscheidung von O104:H4 herabsetzt (Nitschke et al, 2012). Dennoch wird im

---

Allgemeines bei der Behandlung von HUS von der Antibiotika-Gabe abgeraten (Wong et al, 2000).

Hinsichtlich der hier diskutierten Biofilmeigenschaften des Ausbruchstammes wären alternative Behandlungsmöglichkeiten denkbar, die mit der c-di-GMP-abhängigen Biofilmbildung interferieren. Eine solche Behandlung könnte zum einen extrazellulär durch Störung der Adhäsion an Epithelzellen oder der Assemblierung von Matrixkomponenten wirken (Cegelski et al, 2009). Auch Therapeutika mit intrazellulärer Wirkungsweise, die etwa die c-di-GMP-Signalkaskade und damit Biofilmbildung und Synthese c-di-GMP-abhängiger Virulenzfaktoren inhibieren und die Dispersion von Biofilmen stimulieren, sollten in Betracht gezogen werden. Gleichmaßen verspricht eine probiotische Behandlung mit *E. coli* Nissle 1917 gute Erfolgsaussichten. Der kommensale *E. coli*-Stamm produziert bei 37°C Cellulose und antagonisiert in Co-Kultivierung mit O104:H4 dessen adhäsiven Eigenschaften und reduziert die Stx2-Ausschüttung (Mohsin et al, 2015; Rund et al, 2013). Darüber hinaus sind die amyloiden Curli-Fasern nicht derart exponiert wie in Cellulose-negativen Biofilmen, was ihre proinflammatorische Wirkung herabsetzt (Wang et al, 2006).

c-di-GMP kann auch außerhalb des Wirtes die Expression und Ausscheidung extrazellulärer Matrixsubstanzen fördern. Al Safadi et al. beschrieben eine verstärkte Expression des *pgaABCD*-Operons in *E. coli* O104:H4, welches für die Synthese des Exopolysaccharides PGA essentiell ist und neben der Biofilmbildung im Wirt auch der Anheftung an Pflanzen dient (Al Safadi et al, 2012; Matthyse et al, 2008; Wang et al, 2004). Gleichmaßen trägt die Synthese von Curli Fimbrien oder Cellulose zur Adhärenz an Pflanzenoberflächen und hier im Besonderen an Sprossen bei (Barak et al, 2005; Matthyse et al, 2008; Torres et al, 2005; Yaron & Römling, 2014). Im Rahmen des O104:H4-Ausbruchs galt der Verzehr kontaminierter Sprossen als wahrscheinlichste Infektionsquelle und auch bei vorhergehenden EHEC-Ausbrüchen wurden rohe Sprossen und andere pflanzliche Kontaminationsquellen ausgemacht (Michino et al, 1999; Taormina et al, 1999). Hohe Mengen an c-di-GMP und damit verbundene Matrixproduktion des Ausbruchstammes bei unter 30°C könnten eine dauerhafte Assoziation mit der Pflanzenoberfläche begünstigt haben.

---

Aus den hier dargestellten Analysen zum Vorhandensein c-di-GMP-metabolisierender Enzyme und der gebildeten Matrixkomponenten des O104:H4 ergibt sich ein zusätzlicher Blickwinkel auf die Virulenz von *E. coli*. Nicht nur klassische Virulenzfaktoren wie Toxin-Produktion oder verstärkte Adhärenz, wie sie charakteristisch für pathogenen Linien sind, beeinflussen das Krankheitsbild. Auch nicht pathogen-spezifische Charakteristika wie amyloide Curli-Fimbrien, die auch von kommensalen Stämmen gebildet werden, können von Relevanz sein. Der Ausbruchsstamm O104:H4 zeigt eine bis dato noch nicht beobachtete Kombination dieser Faktoren. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Rolle amyloider Curli Fimbrien können dazu beitragen, bakterielle Infektionen nicht mehr nur ausschließlich aus der medizinischen Sicht zu beurteilen, sondern vermehrt auch den mikrobiologischen Standpunkt einzubeziehen.

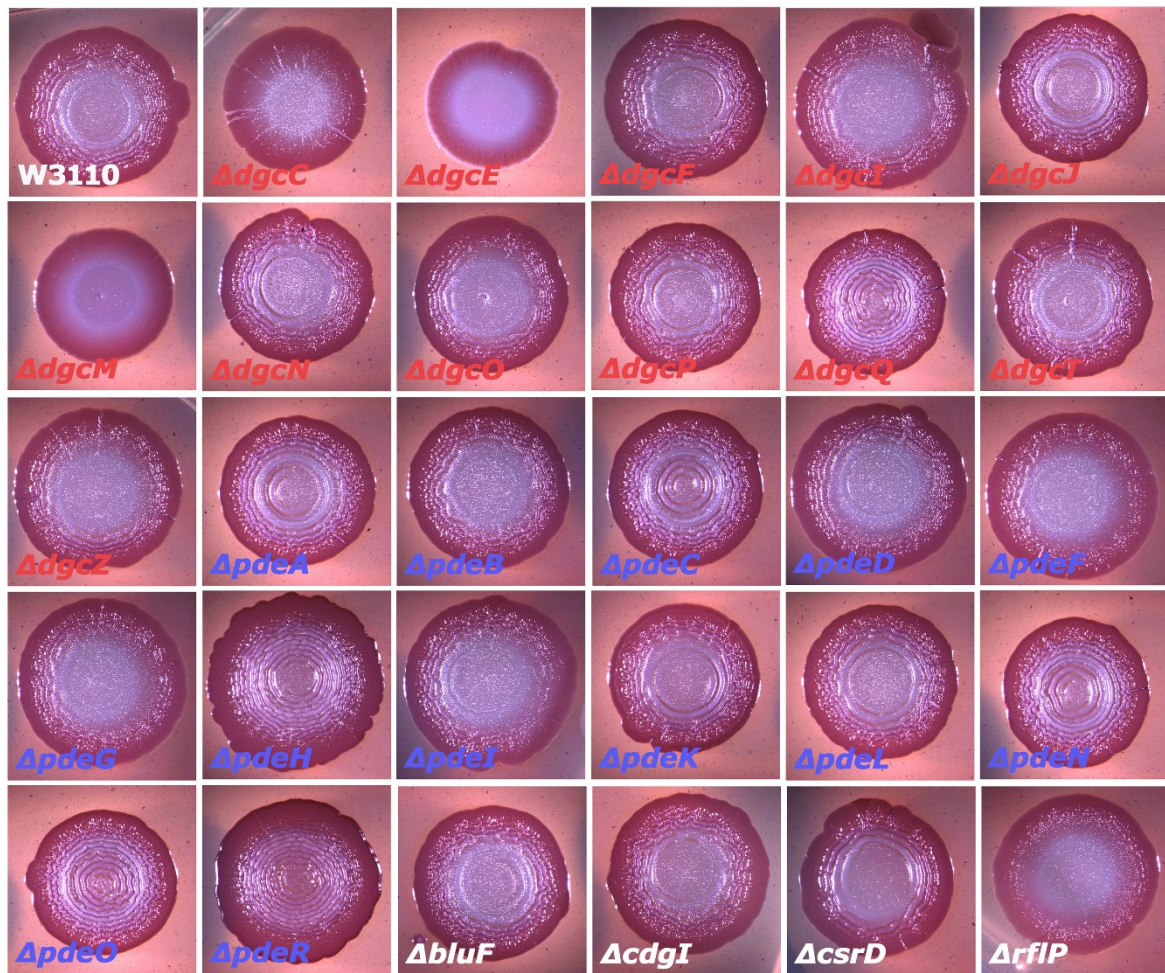


## 6. Anhang

**Tab. A1.** Überblick aller 29 von *E. coli* K-12 kodierten GGDEF-/EAL-Protein-kodierender Gene.

Genname	alternat. Bezeichnung	Domänen-Architektur <sup>1</sup>	TMD <sup>2</sup>	RpoS-reg. <sup>3</sup>
<b>DGC-kodierende Gene (konservierte GGDEF-Domäne)</b>				
<i>dgcC</i>	<i>yaiC, adrA</i>	MASE2-GGDEF	x	pos.
<i>dgcE</i>	<i>yegE</i>	MASE1-PAS-PAS-PAS-GGDEF-xEAL	x	pos.
<i>dgcF</i>	<i>yneF</i>	xMASE1-GGDEF	x	
<i>dgcI</i>	<i>yliF</i>	GAPES2-GGDEF	x	
<i>dgcJ</i>	<i>yeaJ</i>	GAPES1-GGDEF	x	
<i>dgcM</i>	<i>ydaM</i>	PAS-PAS-GGDEF		pos.
<i>dgcN</i>	<i>yfiN, tpbB</i>	CHASE8-HAMP-GGDEF	x	
<i>dgcO</i>	<i>yddV, dosC</i>	Globin sensor-GGDEF		pos.
<i>dgcP</i>	<i>yeaP</i>	GAF-GGDEF		
<i>dgcQ</i>	<i>yedQ</i>	CHASE7-xCACHE-GGDEF	x	pos.
<i>dgcT</i>	<i>ycdT</i>	MASE4-GGDEF	x	
<i>dgcZ</i>	<i>ydeH</i>	CZB-GGDEF		neg.
<b>PDE-kodierende Gene (konservierte EAL-Domäne)</b>				
<i>pdeA</i>	<i>yfeA</i>	MASE1-xGGDEF-EAL	x	neg.
<i>pdeB</i>	<i>ylaB</i>	CSS-EAL	x	pos.
<i>pdeC</i>	<i>yjcC</i>	CSS-EAL	x	pos.
<i>pdeD</i>	<i>yoaD</i>	CSS-EAL	x	pos.
<i>pdeF</i>	<i>yfgF</i>	MASE1-xGGDEF-EAL	x	
<i>pdeG</i>	<i>ycgG</i>	CSS-EAL	x	
<i>pdeH</i>	<i>ylhH</i>	EAL		neg.
<i>pdeI</i>	<i>yliE</i>	CHASE9-xCACHE-HAMP-xGGDEF-EAL	x	
<i>pdeK</i>	<i>ylhK</i>	GAPES3-HAMP-xGGDEF-EAL	x	
<i>pdeL</i>	<i>yahA</i>	LuxR-EAL		
<i>pdeN</i>	<i>rtn, gmr</i>	CSS-EAL	x	neg.
<i>pdeO</i>	<i>yddU, dosP</i>	PAS-PAS-xGAF-xGGDEF-EAL		pos.
<i>pdeR</i>	<i>yciR</i>	PAS-xGGDEF-EAL		pos.
<b>Gene zur Kodierung von Proteinen mit degenerierten GGDEF-/EAL-Domänen</b>				
<i>bluF</i>	<i>ycgF</i>	BLUF-xEAL		neg.
<i>cdgI</i>	<i>yeal</i>	MASE4-xGGDEF	x	
<i>csrD</i>	<i>yhdA</i>	GAPES4-xGGDEF-xEAL	x	
<i>rflP</i>	<i>ydiV</i>	xEAL		

<sup>1</sup> Domänenarchitektur und Nomenklatur übernommen aus (Hengge et al, 2015). Ein „x“ vor der Domäne zeigt an, dass es sich um eine laut Aminosäureresten voraussichtlich inaktive Domäne handelt. <sup>2</sup> Transmembran-Domänen in der inneren Zellmembran. <sup>3</sup> Regulation durch RpoS nach (Sommerfeldt et al, 2009).



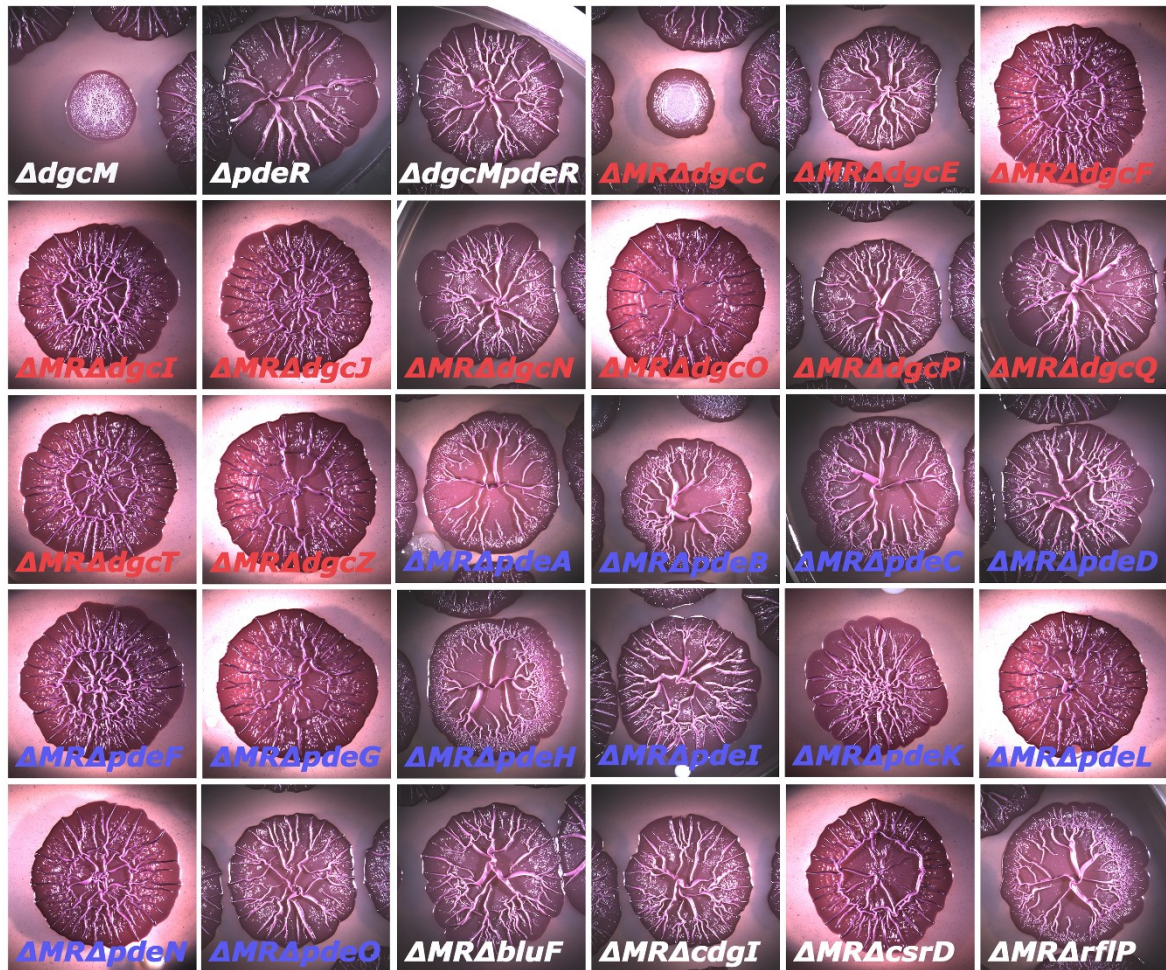
**Abb. A1. Makrokolonien im Curli produzierenden W3110 und den entsprechenden 29 GGDEF/EAL-Gen-Deletionen.** Mutationen von DGCs sind rot hervorgehoben, von PDEs blau. Mutanten der stark degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteine sind weiß dargestellt. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf LBnoS mit Congo-Rot (vgl. Abb. 13).







**Abb. A2. Makrokolonien im Cellulose produzierenden AR3110  $\Delta csgB$  und den entsprechenden 29 GGDEF/EAL-Gen-Deletionen im  $\Delta csgB$ -Hintergrund nach drei (oben) bzw. sechs (unten) Tagen.** Mutationen von DGCs sind rot hervorgehoben, von PDEs blau. Mutanten der stark degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteine sind weiß dargestellt. Die Inkubation erfolgte bei 28°C auf LBnoS mit Congo-Rot (vgl. Abb. 13).



**Abb. A3. Makrokolonien im AR3110  $\Delta dgcM\Delta pdeR$ -Hintergrund und den entsprechenden 27 GGDEF/EAL-Trippl-Mutanten.** Mutationen von DGCs sind rot hervorgehoben, von PDEs blau. Mutanten der stark degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteine, sowie  $dgcM/pdeR$ -Einzelmutanten und die Doppelmutterante sind weiß dargestellt. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28°C auf LBnoS mit Congo-Rot (vgl. Abb. 13).

## 7. Referenzen

- Ades SE, Hayden JD, Laubacher ME (2011) Envelope Stress. In *Bacterial Stress Responses*, Storz G, Hengge R (eds), Vol. 2, 8, pp 115-131. Washington, D.C.: ASM Press
- Al Safadi R, Abu-Ali GS, Sloup RE, Rudrik JT, Waters CM, Eaton KA, Manning SD (2012) Correlation between in vivo biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS One* **7**: e41628
- Amarasinghe JJ, D'Hondt RE, Waters CM, Mantis NJ (2013) Exposure of *Salmonella enterica* Serovar typhimurium to a protective monoclonal IgA triggers exopolysaccharide production via a diguanylate cyclase-dependent pathway. *Infect Immun* **81**: 653-664
- Amikam D, Galperin MY (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6
- Anantharaman V, Aravind L (2000) Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem Sci* **25**: 535-537
- Andreoli SP, Trachtman H, Acheson DW, Siegler RL, Obrig TG (2002) Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatric nephrology* **17**: 293-298
- Anwar N, Rouf SF, Römling U, Rhen M (2014) Modulation of Biofilm-Formation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by the Periplasmic DsbA/DsbB Oxidoreductase System Requires the GGDEF-EAL Domain Protein STM3615. *PLoS One* **9**: e106095
- Aravind L, Koonin EV (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* **23**: 469-472
- Aravind L, Ponting CP (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* **176**: 111-116
- Bachmann BJ (1996) Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of *Escherichia coli* K-12. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low Jr KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, HE U (eds), 2 edn, pp 2460-2488. Washington, DC: ASM Press
- Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* **307**: 97-101
- Barak JD, Gorski L, Naraghi-Arani P, Charkowski AO (2005) *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5685-5691
- Barak JD, Jahn CE, Gibson DL, Charkowski AO (2007) The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1083-1091
- Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, Harwood CS (2012) The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* **40**: 7207-7218
- Barembuch C, Hengge R (2007) Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol* **65**: 76-89

- 
- Barends TR, Hartmann E, Griesse JJ, Beitlich T, Kirienko NV, Ryjenkov DA, Reinstein J, Shoeman RL, Gomelsky M, Schlichting I (2009) Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**: 1015-1018
- Barnhart DM, Su S, Baccaro BE, Banta LM, Farrand SK (2013) CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of *Caulobacter*, regulates cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 7188-7202
- Bayburt TH, Sligar SG (2010) Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett* **584**: 1721-1727
- Becker G, Klauck E, Hengge-Aronis R (1999) Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6439-6444
- Benach J, Swaminathan SS, Tamayo R, Handelman SK, Foltá-Stogniew E, Ramos JE, Forouhar F, Neely H, Seetharaman J, Camilli A, Hunt JF (2007) The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *Embo J* **26**: 5153-5166
- Benziman M, Haigler CH, Brown RM, White AR, Cooper KM (1980) Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 6678-6682
- Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S (2000) Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *The Journal of infectious diseases* **181**: 602-612
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Kock R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* **11**: 671-676
- Blondel A, Bedouelle H (1991) Engineering the quaternary structure of an exported protein with a leucine zipper. *Protein engineering* **4**: 457-461
- Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, Mack D, Perry RD (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol* **10**: 1419-1432
- Boehm A, Kaiser M, Li H, Spangler C, Kasper CA, Ackermann M, Kaefer V, Sourjik V, Roth V, Jenal U (2010) Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**: 107-116
- Boehm A, Steiner S, Zaehring F, Casanova A, Hamburger F, Ritz D, Keck W, Ackermann M, Schirmer T, Jenal U (2009) Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol* **72**: 1500-1516
- Botsford JL, Harman JG (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**: 100-122
- Boyd CD, O'Toole GA (2012) Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 439-462
- Brandl MT, Carter MQ, Parker CT, Chapman MR, Huynh S, Zhou Y (2011) *Salmonella* biofilm formation on *Aspergillus niger* involves cellulose--chitin interactions. *PLoS One* **6**: e25553
- Braun V, Mahren S (2005) Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the *Escherichia coli* Fec type. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 673-684

- 
- Brombacher E, Baratto A, Dorel C, Landini P (2006) Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol* **188**: 2027-2037
- Brombacher E, Dorel C, Zehnder AJ, Landini P (2003) The curli biosynthesis regulator CsgD coordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 2847-2857
- Brown C, Leijon F, Bulone V (2012) Radiometric and spectrophotometric in vitro assays of glycosyltransferases involved in plant cell wall carbohydrate biosynthesis. *Nature protocols* **7**: 1634-1650
- Brown PK, Dozois CM, Nickerson CA, Zuppardo A, Terlonge J, Curtiss R, 3rd (2001) MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **41**: 349-363
- Brown RM, Jr., Willison JH, Richardson CL (1976) Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 4565-4569
- Browning DF, Busby SJ (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57-65
- Buchholz U, Bernard H, Werber D, Bohmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Delere Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Hohle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubert P, Rosner B, Stark K, Kuhne M (2011) German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *The New England journal of medicine* **365**: 1763-1770
- Buckstein MH, He J, Rubin H (2008) Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 718-726
- Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE (2011) STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**: 515-518
- Bureau TE, Brown RM (1987) In vitro synthesis of cellulose II from a cytoplasmic membrane fraction of *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6985-6989
- Carpita NC (2011) Update on mechanisms of plant cell wall biosynthesis: how plants make cellulose and other (1->4)-beta-D-glycans. *Plant Physiol* **155**: 171-184
- Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND, Cusumano CK, Hung CS, Chorell E, Aberg V, Walker JN, Seed PC, Almqvist F, Chapman MR, Hultgren SJ (2009) Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature chemical biology* **5**: 913-919
- Chan C, Paul R, Samoray D, Amiot NC, Giese B, Jenal U, Schirmer T (2004) Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17084-17089
- Chang WS, van de Mortel M, Nielsen L, Nino de Guzman G, Li X, Halverson LJ (2007) Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* **189**: 8290-8299
- Chen ZH, Schaap P (2015) Secreted cyclic-di-GMP induces stalk cell differentiation in the eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J Bacteriol*: 00321-00315

- 
- Chevance FF, Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**: 455-465
- Chilcott GS, Hughes KT (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708
- Chin KH, Lee YC, Tu ZL, Chen CH, Tseng YH, Yang JM, Ryan RP, McCarthy Y, Dow JM, Wang AH, Chou SH (2010) The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* **396**: 646-662
- Chopra I, O'Neill AJ, Miller K (2003) The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **6**: 137-145
- Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A, Jenal U (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**: 30829-30837
- Christen M, Kulasekara HD, Christen B, Kulasekara BR, Hoffman LR, Miller SI (2010) Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* **328**: 1295-1297
- Christiansen C, Abou Hachem M, Janecek S, Vikso-Nielsen A, Blennow A, Svensson B (2009) The carbohydrate-binding module family 20--diversity, structure, and function. *The FEBS journal* **276**: 5006-5029
- Cohen D, Mechold U, Nevenzal H, Yarmiyhu Y, Randall TE, Bay DC, Rich JD, Parsek MR, Kaever V, Harrison JJ, Banin E (2015) Oligoribonuclease is a central feature of cyclic diguanylate signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 11359-11364
- Commichau FM, Stülke J (2008) Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol Microbiol* **67**: 692-702
- Corrigan RM, Grundling A (2013) Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat Rev Microbiol* **11**: 513-524
- Da Re S, Ghigo JM (2006) A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 3073-3087
- Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645
- Davey ME, O'Toole G A (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847-867
- Davies BW, Bogard RW, Young TS, Mekalanos JJ (2012) Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell* **149**: 358-370
- de Jong W, Wosten HA, Dijkhuizen L, Claessen D (2009) Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* **73**: 1128-1140
- Delmer DP (1999) CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 245-276



- 
- Deng Y, Schmid N, Wang C, Wang J, Pessi G, Wu D, Lee J, Aguilar C, Ahrens CH, Chang C, Song H, Eberl L, Zhang LH (2012) Cis-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 15479-15484
- DePas WH, Hufnagel DA, Lee JS, Blanco LP, Bernstein HC, Fisher ST, James GA, Stewart PS, Chapman MR (2013) Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 2629-2634
- DePas WH, Syed AK, Sifuentes M, Lee JS, Warshaw D, Saggar V, Csankovszki G, Boles BR, Chapman MR (2014) Biofilm formation protects *Escherichia coli* against killing by *Caenorhabditis elegans* and *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **80**: 7079-7087
- Domozych DS, Ciancia M, Fangel JU, Mikkelsen MD, Ulvskov P, Willats WG (2012) The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in plant science* **3**: 82
- Duerig A, Abel S, Folcher M, Nicollier M, Schwede T, Amiot N, Giese B, Jenal U (2009) Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23**: 93-104
- Elasri MO, Miller RV (1999) Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2025-2031
- Fang X, Ahmad I, Blanka A, Schottkowski M, Cimdins A, Galperin MY, Römling U, Gomelsky M (2014) GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Mol Microbiol* **93**: 439-452
- Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T (2014) Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol* **16**: 1961-1981
- Fazli M, McCarthy Y, Givskov M, Ryan RP, Tolker-Nielsen T (2012) The exopolysaccharide gene cluster Bcam1330-Bcam1341 is involved in *Burkholderia cenocepacia* biofilm formation, and its expression is regulated by c-di-GMP and Bcam1349. *Microbiologyopen* **2**: 105-122
- Fazli M, O'Connell A, Nilsson M, Niehaus K, Dow JM, Givskov M, Ryan RP, Tolker-Nielsen T (2011) The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* **82**: 327-341
- Ferenci T (2001) Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state. *Environ Microbiol* **3**: 605-611
- Fiedler U, Weiss V (1995) A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *EMBO J* **14**: 3696-3705
- Galperin MY (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**: 552-567
- Galperin MY, Natale DA, Aravind L, Koonin EV (1999) A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 303-305
- Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 11-21

- 
- Garcia B, Latasa C, Solano C, Garcia-del Portillo F, Gamazo C, Lasa I (2004) Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* **54**: 264-277
- Gardner KH, Blackwell J (1974) The hydrogen bonding in native cellulose. *Biochimica et biophysica acta* **343**: 232-237
- Gerstel U, Römmling U (2001) Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* **3**: 638-648
- Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH (2011) Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5238-5246
- Ghafoor A, Jordens Z, Rehm BH (2013) Role of PelF in pel polysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2968-2978
- Gilbert P, Das J, Foley I (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**: 160-167
- Glass JL, Assad-Garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, Maruf M, Hutchison CA, 3rd, Smith HO, Venter JC (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 425-430
- Grimson MJ, Haigler CH, Blanton RL (1996) Cellulose microfibrils, cell motility, and plasma membrane protein organization change in parallel during culmination in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* **109**: 3079-3087
- Gruber TM, Gross CA (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466
- Guyon SL, Simm R, Rehn M, Römmling U (2014) Dissecting the cyclic di-guanylate monophosphate signalling network regulating motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Environ Microbiol* **17**: 1310-1320
- Haigler CH, Brown RM, Jr., Benziman M (1980) Calcofluor white ST Alters the in vivo assembly of cellulose microfibrils. *Science* **210**: 903-906
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95-108
- Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S (1995) Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**: 661-670
- Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP (2006) Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 12-18
- Hay ID, Remminghorst U, Rehm BH (2009) MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1110-1120
- Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H, Horiuchi T (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0007
- Helmann JD (2011) Regulation by alternative sigma factors In *Bacterial Stress Responses*, Storz G, Hengge R (eds), 2 edn, 3, pp 31-43. Washington, D.C.: ASM Press

- 
- Hengge-Aronis R (2002) Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 341-346
- Hengge R (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263-273
- Hengge R (2010) Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. *Sci Signal* **3**: pe44
- Hengge R (2011) The general stress response in Gram-negative bacteria. In *Bacterial Stress Responses*, Storz G, Hengge R (eds), 2 edn, 15, pp 251-289. Washington, D.C.: ASM Press
- Hengge R, Galperin MY, Ghigo JM, Gomelsky M, Green J, Hughes KT, Jenal U, Landini P (2015) Systematic nomenclature for GGDEF and EAL domain-containing c-di-GMP turnover proteins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*: 00424-00415
- Heuveling J, Frochaux V, Ziolkowska J, Wawrzinek R, Wessig P, Herrmann A, Schneider E (2014) Conformational changes of the bacterial type I ATP-binding cassette importer HisQMP2 at distinct steps of the catalytic cycle. *Biochimica et biophysica acta* **1838**: 106-116
- Hickman JW, Harwood CS (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**: 376-389
- Higgins LM, Frankel G, Connerton I, Goncalves NS, Dougan G, MacDonald TT (1999) Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science* **285**: 588-591
- Hirose E, Nakashima K, Nishino A (2011) Is there intracellular cellulose in the appendicularian tail epidermis? A tale of the adult tail of an invertebrate chordate. *Communicative & integrative biology* **4**: 768-771
- Ho YS, Burden LM, Hurley JH (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J* **19**: 5288-5299
- Hobley L, Ostrowski A, Rao FV, Bromley KM, Porter M, Prescott AR, MacPhee CE, van Aalten DM, Stanley-Wall NR (2013) BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 13600-13605
- Hoch JA (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**: 165-170
- Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**: 1171-1175
- Hubbard C, McNamara JT, Azumaya C, Patel MS, Zimmer J (2012) The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol* **418**: 21-31
- Huertas MG, Zarate L, Acosta IC, Posada L, Cruz DP, Lozano M, Zambrano MM (2014) *Klebsiella pneumoniae* yfiRNB operon affects biofilm formation, polysaccharide production and drug susceptibility. *Microbiology* **160**: 2595-2606
- Hufnagel DA, DePas WH, Chapman MR (2014) The Disulfide Bonding System Suppresses CsgD-independent Cellulose Production in *E. coli*. *J Bacteriol* **196**: 3690-3699
- Hung C, Zhou Y, Pinkner JS, Dodson KW, Crowley JR, Heuser J, Chapman MR, Hadjifrangiskou M, Henderson JP, Hultgren SJ (2013) *Escherichia coli* Biofilms Have an Organized and Complex Extracellular Matrix Structure. *MBio* **4**: e00645-00613

- 
- Izano EA, Sadvovskaya I, Wang H, Vinogradov E, Ragunath C, Ramasubbu N, Jabbouri S, Perry MB, Kaplan JB (2008) Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* **44**: 52-60
- Jenal U, Malone J (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**: 385-407
- Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nystrom T (2002) Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* **16**: 1260-1270
- Johannes L, Romer W (2010) Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **8**: 105-116
- Jonas K, Edwards AN, Simm R, Romeo T, Römling U, Melefors O (2008) The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol* **70**: 236-257
- Kader A, Simm R, Gerstel U, Morr M, Römling U (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60**: 602-616
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756
- Kazmierczak BI, Lebron MB, Murray TS (2006) Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **60**: 1026-1043
- Keiski CL, Harwich M, Jain S, Neculai AM, Yip P, Robinson H, Whitney JC, Riley L, Burrows LL, Ohman DE, Howell PL (2010) AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. *Structure* **18**: 265-273
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520
- Kirillina O, Fetherston JD, Bobrov AG, Abney J, Perry RD (2004) HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* **54**: 75-88
- Koestler BJ, Waters CM (2014) Intestinal GPS: bile and bicarbonate control cyclic di-GMP to provide *Vibrio cholerae* spatial cues within the small intestine. *Gut microbes* **5**: 775-780
- Kroupitski Y, Brandl MT, Pinto R, Belausov E, Tamir-Ariel D, Burdman S, Sela Saldinger S (2013) Identification of *Salmonella enterica* genes with a role in persistence on lettuce leaves during cold storage by recombinase-based in vivo expression technology. *Phytopathology* **103**: 362-372
- Kulasekara BR, Kamischke C, Kulasekara HD, Christen M, Wiggins PA, Miller SI (2013) c-di-GMP heterogeneity is generated by the chemotaxis machinery to regulate flagellar motility. *eLife* **2**: e01402
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

- 
- Lange R, Fischer D, Hengge-Aronis R (1995) Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 4676-4680
- Lange R, Hengge-Aronis R (1991a) Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol* **173**: 4474-4481
- Lange R, Hengge-Aronis R (1991b) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 49-59
- Lange R, Hengge-Aronis R (1994) The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev* **8**: 1600-1612
- Lasa I (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol* **9**: 21-28
- Le Quere B, Ghigo JM (2009) BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Mol Microbiol* **72**: 724-740
- Lee DJ, Minchin SD, Busby SJ (2012) Activating transcription in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **66**: 125-152
- Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, Sudarsan N, Breaker RR (2010) An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329**: 845-848
- Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* **65**: 1474-1484
- Liang ZX (2015) The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Natural product reports* **32**: 663-683
- Lim B, Gross CA (2011) Cellular Response to Heat Shock and Cold Shock. In *Bacterial Stress Responses*, Storz G, Hengge R (eds), Vol. 2, 7, pp 93-114. Washington, D.C.: ASM Press
- Lindenberg S, Klauck G, Pesavento C, Klauck E, Hengge R (2013) The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J* **32**: 2001-2014
- Liu N, Xu Y, Hossain S, Huang N, Coursolle D, Gralnick JA, Boon EM (2012) Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry* **51**: 2087-2099
- Lucht JM, Dersch P, Kempf B, Bremer E (1994) Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled proU operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 6578-6578
- Ma Q, Yang Z, Pu M, Peti W, Wood TK (2011) Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environ Microbiol* **13**: 631-642
- Magnusson LU, Farewell A, Nystrom T (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**: 236-242
- Malone JG, Jaeger T, Manfredi P, Dotsch A, Blanka A, Bos R, Cornelis GR, Haussler S, Jenal U (2012) The YfiBNR signal transduction mechanism reveals novel targets for the evolution of persistent *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways. *PLoS Pathog* **8**: e1002760

- 
- Matthysse AG, Deora R, Mishra M, Torres AG (2008) Polysaccharides cellulose, poly-beta-1,6-n-acetyl-D-glucosamine, and colanic acid are required for optimal binding of *Escherichia coli* O157:H7 strains to alfalfa sprouts and K-12 strains to plastic but not for binding to epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2384-2390
- Matthysse AG, Marry M, Krall L, Kaye M, Ramey BE, Fuqua C, White AR (2005) The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1002-1010
- Matthysse AG, Thomas DL, White AR (1995a) Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **177**: 1076-1081
- Matthysse AG, White S, Lightfoot R (1995b) Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **177**: 1069-1075
- McNamara JT, Morgan JL, Zimmer J (2015) A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **84**: 895-921
- Mellmann A, Bielaszewska M, Kock R, Friedrich AW, Fruth A, Middendorf B, Harmsen D, Schmidt MA, Karch H (2008) Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases* **14**: 1287-1290
- Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H (2011) Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* **6**: e22751
- Merighi M, Lee VT, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S (2007) The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**: 876-895
- Merrick MJ (1993) In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* **10**: 903-909
- Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A, Yanagawa H (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American journal of epidemiology* **150**: 787-796
- Mika F, Hengge R (2013) Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci* **14**: 4560-4579
- Mika F, Hengge R (2014) Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA biology* **11**: 494-507
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mills E, Petersen E, Kulasekara BR, Miller SI (2015) A direct screen for c-di-GMP modulators reveals a *Salmonella* Typhimurium periplasmic L-arginine-sensing pathway. *Sci Signal* **8**: ra57
- Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI (2011) The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* **13**: 1122-1129

- 
- Miroux B, Walker JE (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298
- Mohsin M, Guenther S, Schierack P, Tedin K, Wieler LH (2015) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces growth, Shiga toxin expression, release and thus cytotoxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **305**: 20-26
- Morgan JL, McNamara JT, Zimmer J (2014) Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nature structural & molecular biology* **21**: 489-496
- Morgan JL, Strumillo J, Zimmer J (2012) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**: 181-186
- Mossoro C, Glaziou P, Yassibanda S, Lan NT, Bekondi C, Minssart P, Bernier C, Le Bouguenec C, Germani Y (2002) Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEp-2 adherent *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. *J Clin Microbiol* **40**: 3086-3088
- Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brussow H (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4065-4073
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201
- Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL (1998) Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases* **4**: 251-261
- Nelson JW, Sudarsan N, Phillips GE, Stav S, Lunse CE, McCown PJ, Breaker RR (2015) Control of bacterial exoelectrogenesis by c-AMP-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 5389-5394
- Newell PD, Monds RD, O'Toole GA (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3461-3466
- Nikolskaya AN, Mulikjanian AY, Beech IB, Galperin MY (2003) MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 11-16
- Nishiyama Y, Sugiyama J, Chanzy H, Langan P (2003) Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I(alpha) from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 14300-14306
- Nitschke M, Sayk F, Hartel C, Roseland RT, Hauswaldt S, Steinhoff J, Fellermann K, Derad I, Wellhoner P, Buning J, Tiemer B, Katalinic A, Rupp J, Lehnert H, Solbach W, Knobloch JK (2012) Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* O104:H4. *Jama* **307**: 1046-1052
- Nobles DR, Romanovicz DK, Brown RM, Jr. (2001) Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiol* **127**: 529-542
- Norinder BS, Luthje P, Yadav M, Kadas L, Fang H, Nord CE, Brauner A (2011) Cellulose and PapG are important for *Escherichia coli* causing recurrent urinary tract infection in women. *Infection* **39**: 571-574
- Notley SM, Pettersson B, Wagberg L (2004) Direct measurement of attractive van der Waals' forces between regenerated cellulose surfaces in an aqueous environment. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 13930-13931

- 
- Olsen A, Wick MJ, Morgelin M, Bjorck L (1998) Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun* **66**: 944-949
- Omadjela O, Narahari A, Strumillo J, Melida H, Mazur O, Bulone V, Zimmer J (2013) BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 17856-17861
- Orr MW, Donaldson GP, Severin GB, Wang J, Sintim HO, Waters CM, Lee VT (2015) Oligoribonuclease is the primary degradative enzyme for pGpG in *Pseudomonas aeruginosa* that is required for cyclic-di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E5048-5057
- Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM (1989) Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The Journal of infectious diseases* **160**: 994-998
- Ostrowski A, Mehert A, Prescott A, Kiley TB, Stanley-Wall NR (2011) YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**: 4821-4831
- Pagant S, Bichet A, Sugimoto K, Lerouxel O, Desprez T, McCann M, Lerouge P, Vernhettes S, Hofte H (2002) KOBITO1 encodes a novel plasma membrane protein necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2001-2013
- Park YW, Yun HD (1999) Cloning of the *Escherichia coli* endo-1,4-D-glucanase gene and identification of its product. *Mol Gen Genet* **261**: 236-241
- Parsek MR, Singh PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **57**: 677-701
- Pesavento C, Becker G, Sommerfeldt N, Possling A, Tschowri N, Mehliis A, Hengge R (2008) Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**: 2434-2446
- Pesavento C, Hengge R (2009) Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol* **12**: 170-176
- Pesavento C, Hengge R (2012) The global repressor FliZ antagonizes gene expression by sigmaS-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **40**: 4783-4793
- Ponting CP, Aravind L (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Current biology : CB* **7**: R674-677
- Povolotsky TL, Hengge R (2012) 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. *J Biotechnol* **160**: 10-16
- Povolotsky TL, Hengge R (2015) Genome-based comparison of c-di-GMP signaling in pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol*: 00520-00515
- Powell BS, Rivas MP, Court DL, Nakamura Y, Turnbough CL, Jr. (1994) Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res* **22**: 5765-5766



- 
- Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**: 285-293
- Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, Ambert A, Lejeune P, Landini P, Dorel C (2001) Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol* **183**: 7213-7223
- Pultz IS, Christen M, Kulasekara HD, Kennard A, Kulasekara B, Miller SI (2012) The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* **86**: 1424-1440
- Qi Y, Chuah ML, Dong X, Xie K, Luo Z, Tang K, Liang ZX (2011) Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem* **286**: 2910-2917
- Rao F, Yang Y, Qi Y, Liang ZX (2008) Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**: 3622-3631
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin CS, Iliopoulos D, Klammer A, Peluso P, Lee L, Kislyuk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyert SR, Frimodt-Moller J, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE, Waldor MK (2011) Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *The New England journal of medicine* **365**: 709-717
- Rehman ZU, Rehm BH (2013) Dual roles of *Pseudomonas aeruginosa* AlgE in secretion of the virulence factor alginate and formation of the secretion complex. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2002-2011
- Remminghorst U, Rehm BH (2006a) Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **580**: 3883-3888
- Remminghorst U, Rehm BH (2006b) In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 298-305
- Richter A (2011) Wachstumsverhalten, Motilität und Biofilm-Bildung der *Escherichia coli* K-12 Laborstämme W3110, MG1655 und MC4100. Master Thesis, Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin
- Richter AM, Povolotsky TL, Wieler LH, Hengge R (2014) Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. *EMBO molecular medicine* **6**: 1622-1637
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England journal of medicine* **308**: 681-685
- Ritchie TK, Grinkova YV, Bayburt TH, Denisov IG, Zolnerchik JK, Atkins WM, Sligar SG (2009) Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol* **464**: 211-231
- Römling U (2002) Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* **153**: 205-212
- Römling U, Brown RM, Saxena IM (2007) Cellulose Biosynthesis in *Enterobacteriaceae*. In *Cellulose: Molecular and Structural Biology*, pp 107-122. Springer Netherlands

- 
- Römling U, Galperin MY (2015) Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol* **23**: 545-57
- Römling U, Galperin MY, Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 1-52
- Römling U, Rohde M, Olsen A, Normark S, Reinkoster J (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* **36**: 10-23
- Römling U, Sierralta WD, Eriksson K, Normark S (1998) Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Mol Microbiol* **28**: 249-264
- Ross P, Mayer R, Benziman M (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55**: 35-58
- Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH, Benziman M (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279-281
- Rosser T, Dransfield T, Allison L, Hanson M, Holden N, Evans J, Naylor S, La Ragione R, Low JC, Gally DL (2008) Pathogenic potential of emergent sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. *Infect Immun* **76**: 5598-5607
- Roudier F, Fernandez AG, Fujita M, Himmelsbach R, Borner GH, Schindelman G, Song S, Baskin TI, Dupree P, Wasteneys GO, Benfey PN (2005) COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell* **17**: 1749-1763
- Rund SA, Rohde H, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA (2013) Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. *Int J Med Microbiol* **303**: 1-8
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Crossman LC, Spiro S, He YW, Zhang LH, Heeb S, Camara M, Williams P, Dow JM (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6712-6717
- Ryan RP, Tolker-Nielsen T, Dow JM (2012) When the PilZ don't work: effectors for cyclic di-GMP action in bacteria. *Trends Microbiol* **20**: 235-242
- Ryjenkov DA, Simm R, Römling U, Gomelsky M (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**: 30310-30314
- Ryjenkov DA, Tarutina M, Moskvina OV, Gomelsky M (2005) Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* **187**: 1792-1798
- Saldana Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Giron JA (2009) Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol* **11**: 992-1006
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 
- Savakis P, De Causmaecker S, Angerer V, Ruppert U, Anders K, Essen LO, Wilde A (2012) Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **85**: 239-251
- Saxena IM, Brown RM, Jr. (2005) Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot* **96**: 9-21
- Saxena IM, Kudlicka K, Okuda K, Brown RM, Jr. (1994) Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol* **176**: 5735-5752
- Schaap P (2013) Cyclic di-nucleotide signaling enters the eukaryote domain. *IUBMB life* **65**: 897-903
- Schirmer T, Jenal U (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* **7**: 724-735
- Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M (2005) The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* **187**: 4774-4781
- Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M (2007) Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J Bacteriol* **189**: 6645-6654
- Serra DO, Hengge R (2014) Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol* **16**: 1455-1471
- Serra DO, Klauck G, Hengge R (2015) Vertical stratification of matrix production is essential for physical integrity and architecture of macrocolony biofilms of *Escherichia coli*. *Environ Microbiol*: 1462-2920
- Serra DO, Richter AM, Hengge R (2013a) Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *J Bacteriol* **195**: 5540-5554
- Serra DO, Richter AM, Klauck G, Mika F, Hengge R (2013b) Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* **4**: e00103-00113
- Sethaphong L, Haigler CH, Kubicki JD, Zimmer J, Bonetta D, DeBolt S, Yingling YG (2013) Tertiary model of a plant cellulose synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 7512-7517
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **189**: 8746-8749
- Shaikh N, Tarr PI (2003) *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* **185**: 3596-3605
- Simm R, Fetherston JD, Kader A, Römling U, Perry RD (2005) Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. *J Bacteriol* **187**: 6816-6823
- Simm R, Lusch A, Kader A, Andersson M, Römling U (2007) Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **189**: 3613-3623
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**: 1123-1134

- 
- Simons RW, Houman F, Kleckner N (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96
- Skotnicka D, Petters T, Heering J, Hoppert M, Kaefer V, Sogaard-Andersen L (2015) c-di-GMP regulates type IV pili-dependent-motility in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*: 00281-00215
- Smit G, Swart S, Lugtenberg BJ, Kijne JW (1992) Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol* **6**: 2897-2903
- Smith KD, Lipchick SV, Ames TD, Wang J, Breaker RR, Strobel SA (2009) Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nature structural & molecular biology* **16**: 1218-1223
- Solano C, Garcia B, Latasa C, Toledo-Arana A, Zorraquino V, Valle J, Casals J, Pedroso E, Lasa I (2009) Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7997-8002
- Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* **43**: 793-808
- Sommerfeldt N, Possling A, Becker G, Pesavento C, Tschowri N, Hengge R (2009) Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**: 1318-1331
- Soutourina O, Kolb A, Krin E, Laurent-Winter C, Rimsky S, Danchin A, Bertin P (1999) Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J Bacteriol* **181**: 7500-7508
- Spiers AJ (2007) Wrinkly-Spreader fitness in the two-dimensional agar plate microcosm: maladaptation, compensation and ecological success. *PLoS One* **2**: e740
- Spiers AJ (2014) A mechanistic explanation linking adaptive mutation, niche change, and fitness advantage for the wrinkly spreader. *International journal of evolutionary biology* **2014**: 675432
- Spiers AJ, Bohannon J, Gehrig SM, Rainey PB (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* **50**: 15-27
- Steiner S, Lori C, Boehm A, Jenal U (2013) Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *Embo J* **32**: 354-368
- Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR (1996) Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol* **178**: 4885-4893
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215
- Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, Link KH, Breaker RR (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-413
- Suzuki K, Babitzke P, Kushner SR, Romeo T (2006) Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* **20**: 2605-2617

- 
- Sweeney NJ, Laux DC, Cohen PS (1996) *Escherichia coli* F-18 and *E. coli* K-12 eda mutants do not colonize the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect Immun* **64**: 3504-3511
- Takaya A, Erhardt M, Karata K, Winterberg K, Yamamoto T, Hughes KT (2012) YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Mol Microbiol* **83**: 1268-1284
- Tal R, Wong HC, Calhoon R, Gelfand D, Fear AL, Volman G, Mayer R, Ross P, Amikam D, Weinhouse H, Cohen A, Sapir S, Ohana P, Benziman M (1998) Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* **180**: 4416-4425
- Tamayo R, Pratt JT, Camilli A (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **61**: 131-148
- Taormina PJ, Beuchat LR, Slutsker L (1999) Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerging infectious diseases* **5**: 626-634
- Tarutina M, Ryjenkov DA, Gomelsky M (2006) An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**: 34751-34758
- Tchigvintsev A, Xu X, Singer A, Chang C, Brown G, Proudfoot M, Cui H, Flick R, Anderson WF, Joachimiak A, Galperin MY, Savchenko A, Yakunin AF (2010) Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol* **402**: 524-538
- te Loo DM, Monnens LA, van Der Velden TJ, Vermeer MA, Preyters F, Demacker PN, van Den Heuvel LP, van Hinsbergh VW (2000) Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* **95**: 3396-3402
- Thorpe CM, Hurley BP, Lincicome LL, Jacewicz MS, Keusch GT, Acheson DW (1999) Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **67**: 5985-5993
- Topal H, Fulcher NB, Bitterman J, Salazar E, Buck J, Levin LR, Cann MJ, Wolfgang MC, Steegborn C (2012) Crystal structure and regulation mechanisms of the CyaB adenylyl cyclase from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **416**: 271-286
- Torres AG, Jeter C, Langley W, Matthyse AG (2005) Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8008-8015
- Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, Karoui ME, Frapy E, Garry L, Ghigo JM, Gilles AM, Johnson J, Le Bouguenec C, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jehanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit MA, Pichon C, Rouy Z, Ruf CS, Schneider D, Turret J, Vacherie B, Vallenet D, Medigue C, Rocha EP, Denamur E (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS genetics* **5**: e1000344
- Townsley L, Yildiz FH (2015) Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol*: 1462-2920
- Tschowri N, Busse S, Hengge R (2009) The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**: 522-534

- 
- Tschowri N, Lindenberg S, Hengge R (2012) Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **85**: 893-906
- Tschowri N, Schumacher MA, Schlimpert S, Chinnam NB, Findlay KC, Brennan RG, Buttner MJ (2014) Tetrameric c-di-GMP Mediates Effective Transcription Factor Dimerization to Control *Streptomyces* Development. *Cell* **158**: 1136-1147
- Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA (2011) Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *J Mol Biol* **407**: 633-639
- Tükel C, Nishimori JH, Wilson RP, Winter MG, Keestra AM, van Putten JP, Baumler AJ (2010) Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell Microbiol* **12**: 1495-1505
- Tükel C, Wilson RP, Nishimori JH, Pezeshki M, Chromy BA, Baumler AJ (2009) Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell host & microbe* **6**: 45-53
- Vain T, Crowell EF, Timpano H, Biot E, Desprez T, Mansoori N, Trindade LM, Pagant S, Robert S, Hofte H, Gonneau M, Vernhettes S (2014) The Cellulase KORRIGAN Is Part of the Cellulose Synthase Complex. *Plant Physiol* **165**: 1521-1532
- Wada T, Morizane T, Abo T, Tominaga A, Inoue-Tanaka K, Kutsukake K (2011) EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**: 1600-1611
- Wagner PL, Acheson DW, Waldor MK (2001) Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**: 1934-1937
- Wagner PL, Livny J, Neely MN, Acheson DW, Friedman DI, Waldor MK (2002) Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 957-970
- Wang X, Preston JF, 3rd, Romeo T (2004) The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 2724-2734
- Wang X, Rochon M, Lamprokostopoulou A, Lunsdorf H, Nimtz M, Römling U (2006) Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2352-2363
- Wang Y, Hay ID, Rehman ZU, Rehm BH (2015) Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 7253-7265
- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675-2679
- Weber H, Pesavento C, Possling A, Tischendorf G, Hengge R (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 1014-1034
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**: 1591-1603
- Whitney JC, Colvin KM, Marmont LS, Robinson H, Parsek MR, Howell PL (2012) Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **287**: 23582-23593

- 
- Whitney JC, Howell PL (2013) Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* **21**: 63-72
- Williams WS, Cannon RE (1989) Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2448-2452
- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England journal of medicine* **342**: 1930-1936
- Yaron S, Römling U (2014) Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial biotechnology* **7**: 496-516
- Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, Watanabe M, Kimura S, Yutsudo CH, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe H, Yoh M, Iida T, Ohnishi M, Hayashi T, Yasunaga T, Honda T, Sasakawa C, Shinagawa H (2000) Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* **258**: 127-139
- Zeytuni N, Zarivach R (2012) Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure* **20**: 397-405
- Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *The Journal of infectious diseases* **181**: 664-670
- Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**: 1452-1463
- Zorraquino V, Garcia B, Latasa C, Echeverz M, Toledo-Arana A, Valle J, Lasa I, Solano C (2013) Coordinated c-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose. *J Bacteriol* **195**: 417-428

---



---

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Berlin, den 22. September 2015.

Anja Richter